

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ - ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΕΩΣ ΦΥΤΩΝ**

**“ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ ΩΣ ΠΡΟΣ
ΤΗΝ ΑΦΟΜΟΙΩΤΙΚΗ ΤΟΥΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ, ΚΑΙ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ”**

Πτυχιακή διατριβή
της Χορμόβα Ξανθής του Βασιλείου



Υπ. Καθηγητής:
Χ. Κ. Γούλας Καθ. Γενετικής Βελτίωσης

Βόλος 1997



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 72/1
Ημερ. Εισ.: 02-09-2003
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΓΦΖΠ
1997
ΧΟΡ

Βόλος 1997

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070135

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Χ.Κ. Γούλας, Καθηγητής

Υπόλοιπα μέλη της επιτροπής:

Σ. Γαλανοπούλου - Σενδουκά, Καθηγήτρια

Π. Λόλας, Αν. Καθηγητής

Στη Νούλη

Πρόλογος

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή έγινε στο Εργαστήριο Γενετικής Βελτιώσεως Φυτών, με Υπεύθυνο Καθηγητή τον κύριο Γούλα Χρήστο. Θέμα της είναι η αξιολόγηση γενοτύπων καλαμποκιού, ως προς την αφομοιωτική τους ικανότητα και εφαρμογές στη βελτίωση των φυτών.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο Καθηγητή Γενετικής Βελτίωσης, Γούλα Χρήστο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τις γνώσεις και ευκαιρίες που μου έδωσε κατά την διάρκεια της πτυχιακής διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Λέκτορα Μαμούρη Ζήση, για τις διευκρινήσεις και την βοήθεια που μου έδωσε.

Ευχαριστώ ακόμη τον μεταπτυχιακό φοιτητή, Γεωπόνο Κορκόβελο Αθανάσιο για την πολύτιμη βοήθεια του στην στατιστική ανάλυση, γιατί χωρίς την βοήθειά του δεν θα είχε τελειώσει η πτυχιακή διατριβή. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ για την ηθική και όχι μόνο βοήθεια στους Γεωπόνους Στάθη Ευαγγελή, Καραγκιόζη Δημήτρη, καθώς και στους Παρίση Γιώργο, Μηχανικό Γεωργικών Ελκυστήρων και την οικογένειά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
A. Περίληψη.....	7
B. Εισαγωγή.....	9
1. Το καλαμπόκι.....	9
1.1 Γενικά.....	9
1.2 Η γενετική του καλαμποκιού.....	9
1.3 Η βελτίωση του καλαμποκιού.....	11
1.4 Η θρέψη του καλαμποκιού.....	13
1.5 Αζωτούχος λίπανση καλαμποκιού.....	15
2. Η βελτίωση του καλαμποκιού με έμμεση επιλογή βασισμένη σε φυσιολογικά χαρακτηριστικά.....	18
3. Συσχέτιση του LG και μοριακών δεικτών.....	25
4. Σκοπός.....	27
Γ. Υλικά και μέθοδοι.....	28
1. Γενετικό υλικό.....	28
2. Συμβατική αξιολόγηση στο θάλαμο ανάπτυξης.....	33
2.1 Πειραματική αξιολόγηση.....	33
2.2 Ανάλυση - επεξεργασία δεδομένων.....	36
3. Μοριακή αξιολόγηση.....	37
3.1 Θεωρία.....	37
3.2 Πειραματική διαδικασία.....	39
Δ. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	47
1. Συμβατική αξιολόγηση.....	47
2. Μοριακή αξιολόγηση.....	64

Ε. Βιβλιογραφία.....65

Στ. Παράρτημα.....69

A. Περίληψη

Το θέμα της πτυχιακής διατριβής αναφέρεται στην αξιολόγηση γενοτύπων καλαμποκιού ως προς την αφομοιωτική τους ικανότητα και εφαρμογές τους στη βελτίωση των φυτών. Η αξιολόγηση των γενοτύπων έγινε με έμμεσο κριτήριο επιλογής την ένταση του πράσινου χρώματος των φύλλων, δηλαδή την χλωροφύλλη. Η επιλογή με κριτήριο φυσιολογικά χαρακτηριστικά χρειάζεται λιγότερο χρόνο για επιλογή κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, από την αντίστοιχη με κριτήριο την απόδοση. Επίσης η επιλογή μόνο για απόδοση, κάτω από αντίξοες συνθήκες, είναι ανεπαρκής λόγω της υψηλής παραλλακτικότητας και της χαμηλής κληρονομικότητας.

Μελετήθηκε η συμπεριφορά S_0 γενοτύπων ως προς το πράσινο χρώμα των φύλλων σε συνθήκες θαλάμου ανάπτυξης και αγρού. Επίσης έγινε μία προσπάθεια μοριακής ανάλυσης (PCR) με πιθανή συσχέτιση μοριακών δεικτών με το πράσινο χρώμα των φύλλων.

Χρησιμοποιήθηκε ο πληθυσμός καλαμποκιού GR-OP-35 δημιουργία του Ινστιτούτου Σιτηρών, Τμήμα Καλαμποκιού. Πρόκειται για πληθυσμό οδοντόμορφο και πολύδημο με ευρεία γενετική βάση. Κάθε ένας από τους S_0 γενοτύπους αντιπροσωπεύθηκε από τρεις τύπους απογόνων: Των ετεροθαλλών (HS), των αυτογονιμοποιούμενων (S_1) και αυτών από τη διασταύρωση δοκιμής (TC) με την καθαρή σειρά B73 ($S_0 \times B73$).

Τα αποτελέσματα της συμβατικής αξιολόγησης μας έδειξαν ότι η χρησιμοποίηση φυσιολογικών χαρακτηριστικών όπως το πράσινο χρώμα των φύλλων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως

έμμεσο κριτήριο επιλογής γενοτύπων καλαμποκιού. Κατά την μοριακή αξιολόγηση τουλάχιστον των γενοτύπων που εξετάσαμε, δεν βρέθηκαν διαφορές στο γονίδιο της Καταλάσης και συσχέτισή τους με το πράσινο χρώμα των φύλλων.

B. Εισαγωγή

1. Το καλαμπόκι

1.1 Γενικά

Το καλαμπόκι (*Zea mays* L.) είναι η δεύτερη κατά σειρά σπουδαιότητας καλλιέργεια όσον αφορά τα δημητριακά, αμέσως μετά το σιτάρι. Η συνολική παγκόσμια παραγωγή υπερβαίνει τα 400 εκατομμύρια μετρικούς τόννους. Αποτελεί την πρώτη κατά σειρά σπουδαιότητας καλλιέργεια στις Ηνωμένες Πολιτείες, στις οποίες παράγεται σχεδόν το μισό καλαμπόκι σε παγκόσμια κλίμακα. Αμέσως μετά έρχεται η Κίνα και η Βραζιλία (Καλτσίκης, 1992). Η μέση παγκόσμια απόδοση πλησιάζει τα 300 Kg/στρ. Οι μέσες αποδόσεις στην Ελλάδα είναι 1000Kg/στρ, ενώ συνήθως ξεπερνά τα 1200 κιλά το στρέμμα και έχουν επιτευχθεί αποδόσεις πάνω από 2000 Kg/στρ (Σφήκας, 1991).

Το καλαμπόκι ανήκει βοτανικά στα *Gramineae*, στη φυλή *Maydcae*, που περιλαμβάνει επτά γένη. Από τα γένη αυτά, δύο, τα *Zea* και *Tripsacum* είναι αυτοφυή του Δυτικού Ημισφαιρίου ενώ τα υπόλοιπα πέντε προέρχονται από την Ασία (Καλτσίκης, 1992).

1.2. Η γενετική του καλαμπόκιού

Το καλαμπόκι είναι ένα από τα πιο εντατικά μελετημένα φυτά, όσο αφορά τη γενετική και την κυτταρογενετική. Μέχρι τώρα έχουν αναγνωρισθεί αρκετές εκατοντάδες διαφορετικά γονίδια και έχουν σχηματιστεί και χάρτες γενετικής σύνδεσης, οι οποίοι δείχνουν τις σχετικές θέσεις των διαφόρων γονιδίων πάνω στα χρωμοσώματα του καλαμπόκιού με την συμβατική γενετική ανάλυση και τις σύγχρονες μεθόδους της μοριακής γενετικής. Στην

πιο πρόσφατη έκδοση του *Mutants Of Maize*, στις 500 σελίδες περιγράφεται η γενετική και κυτογενετική του καλαμποκιού με την συμβατική και την σύγχρονη μοριακή ανάλυση και παρουσιάζονται όλες οι μεταλλαγμένες μορφές και η χρησιμότητά τους στη σύγχρονη γενετική ανάλυση (Neuffer, et al, 1996).

Το καλαμπόκι καλλιεργείται σε πολλές περιοχές και αποτελεί μια πολύ σημαντική καλλιέργεια από οικονομική άποψη. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η μελέτη της γενετικής του καλαμποκιού είναι αρκετά εύκολη το έκανε φυτό πρότυπο για μελέτη της Γενετικής και Βελτίωσης. Ειδικότερα η μελέτη διευκολύνεται για τους παρακάτω λόγους:

- α. αυτο- ή σταυρογονιμοποιείται πολύ εύκολα,
- β. μία επικονίαση δίνει ένα μεγάλο αριθμό σπόρων,
- γ. υπάρχουν πολλά κληρονομούμενα χαρακτηριστικά, τα οποία επειδή παρατηρούνται εύκολα, μελετούνται και εύκολα,
- δ. το καλαμπόκι έχει πολλά υποτελή γονίδια, τα οποία αποκαλύπτονται εύκολα όταν γίνεται αυτογονιμοποίηση ή όταν χρησιμοποιούνται μεταλλαξιογόνα,
- ε. ο αριθμός των χρωμοσωμάτων είναι μικρός, $2n=20$ και
- στ. τα διάφορα χρωμοσώματα αναγνωρίζονται εύκολα με βάση το μήκος τους και την παρουσία κόμβων κατά μήκος τους (στο στάδιο της παχυνταίνιας), καθώς επίσης και με την ζώνωση μετά από χρώση με Giemsa (Καλτσίκης, 1992).

Το γεγονός ότι οι μέθοδοι για την παραγωγή υβριδίων στο καλαμπόκι βασίστηκαν σε αποτέλεσμα έρευνας που αφορούσαν στην κληρονομικότητά του, έδωσε αφορμή και για άλλες γενετικές μελέτες σ' αυτό το είδος, που αφορούν στη δομή του καλαμποκιού, στην ανθοκυανίνη, στην χλωροφύλλη και στα διάφορα

καροτινοειδή, στη μορφολογία του φυτού και στην κυτταροπλασματική κληρονομικότητα (Καλτσίκης, 1992).

Αρκετές μεταλλαγμένες μορφές έχουν παραχθεί με μεταλλαξιγόνα ή ακτινοβολίες. Οι γενετικές μεταλλάξεις στο καλαμπόκι έχουν δώσει πάρα πολλές πληροφορίες αναφορικά με τη φύση και τον τρόπο δράσης των γονιδίων. Οι πρώτες μελέτες για το φαινόμενο της ετέρωσης έγιναν στο καλαμπόκι (Καλτσίκης, 1992).

1.3 Βελτίωση του καλαμποκιού

Το καλαμπόκι είναι το φυτό πρότυπο για την μελέτη και ανάπτυξη της Ποσοτικής Γενετικής και της Μεθοδολογίας Βελτιώσεως που με τη δημιουργία και αξιοποίηση των υβριδίων επέτυχε τις υψηλές αποδόσεις εκμεταλλευόμενο το φαινόμενο της Ετέρωσης και της Ομομεικτικής Εξασθένησης. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του καλαμποκιού που το καθιστούν φυτό πρότυπο ως γενετικό υλικό είναι ότι είναι φυτό σταυρογονιμοποιούμενο. Ιδιαίτερα δε ως φυτό μόνοικο - δικλινές παρέχει την ευχέρεια σταυρογονιμοποίησεως, αυτογονιμοποίησεως και κατευθυνόμενου υβριδισμού (Γούλας, 1994).

Τα υβρίδια είναι η πρώτη (F_1) γενιά που προέρχεται από τη διασταύρωση δύο ή περισσότερων καθαρών σειρών (Καλτσίκης, 1992). Τα υβρίδια έχουν υψηλότερες αποδόσεις λόγω του φαινομένου της Ετέρωσης σε σύγκριση με τις καθαρές σειρές - γονείς που εκφράζουν την Ομομεικτική Εξασθένηση. Ετέρωση είναι το φαινόμενο όπου το υβρίδιο είναι καλύτερο από την καλύτερη καθαρή σειρά - γονέα. Η ετέρωση εμφανίζεται κυρίως σε ετεροζυγωτική κατάσταση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη

συγκέντρωση πολλών επιθυμητών κυριαρχικών γονιδίων και την επικάλυψη των επιβλαβών υποτελών γονιδίων (Καλτσίκης, 1989). Ως σταυρογονιμοποιούμενο με συνεχείς αυτογονιμοποιήσεις εκφράζει την Ομομεικτική εξασθένηση που εκφράζεται με πολύ χαμηλές αποδόσεις. Η Ομομεικτική εξασθένηση είναι κανόνας χωρίς να αποκλείει και την Ομομεικτική ευρωστία δηλαδή υπεροχή ομοζυγωτού γενοτύπου έναντι ενός αντιστοίχου ετεροζυγωτού. Αυτό βεβαίως δεν είναι το σύνηθες, γιατί μετά την αυτογονιμοποίηση στις καθарές σειρές θα έχουν φιξαριστεί και υποτελή γονίδια, οπότε θα έχουμε απώλεια ευρωστίας λόγω Ομομεικτικής Εξασθένησης (Γούλας, 1994).

Η χρήση της Κυτοπλασματικής Αρρενοστεριρότητας συνέβαλε σημαντικά στην παραγωγή των υβριδίων. Πρόκειται για την περίπτωση που το φυτό δεν παράγει λειτουργική γύρη εξ' αιτίας γενετικών παραγόντων που εδράζονται στα οργανίδια του Κυτοπλάσματος και συγκεκριμένα ορισμένες μορφές πλασμιδίων που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια (Καλτσίκης, 1992). Πριν την χρήση της Κυτοπλασματικής Αρρενοστεριρότητας, για την παραγωγή των υβριδίων του καλαμποκιού κοβόταν η αρσενική ταξιανθία του θηλυκού γονέα, και έτσι η επικονίαση γινόταν από την γύρη του αρσενικού γονέα. Έτσι χρειαζόμασταν πιο πολλά εργατικά χέρια, χρόνο και μεγαλύτερο κόστος. Σήμερα και πάλι χρησιμοποιείται το ξεφούντιασμα κατά κύριο λόγο, λόγω της γενετικής ευπάθειας (Γούλας, 1994)

Τελευταία δίνεται μεγαλύτερη έμφαση στη βελτίωση των πληθυσμών του καλαμποκιού. Ο βελτιωμένος πληθυσμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως μία ελεύθερα επικοινωνιζόμενη ποικιλία ή ως πηγή δημιουργίας καθαρών σειρών. Η βελτίωση των

πληθυσμών μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους Επαναλαμβανόμενης επιλογής (Γούλας, 1994). Στην βελτίωση ενός ή παραπάνω πληθυσμών καλαμποκιού χρησιμοποιούνται τα κυκλικά σχήματα επιλογής για τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Αποβλέπουν στην αύξηση των συχνοτήτων των επιθυμητών γενοτύπων, στη βελτίωση της συνδυαστικής ικανότητας των πληθυσμών, στη δημιουργία πηγών γενετικού υλικού για δημιουργία σειρών που θα αποτελέσουν δομικά συστατικά στοιχεία παραγωγής υβριδίων και τέλος στην ενδοπληθυσμιακή βελτίωση (Γούλας, 1994).

Τα τελευταία 40 χρόνια έχει επιτευχθεί σταθερή αύξηση στην απόδοση των υβριδίων. Η αύξηση αυτή οφείλεται κυρίως στην βελτίωση με άμεση επιλογή της απόδοσης (βάρος σπόρων, πολυδημία κ.α.) και μορφολογικών χαρακτηριστικών που έχουν υψηλή συσχέτιση με την απόδοση (π.χ. ευρωστία, πλάγιασμα αντίσταση σε εχθρούς-ασθένειες κ.α.). Εκτός από την άμεση επιλογή, έχει συνεισφέρει και η έμμεση επιλογή με κριτήρια φυσιολογικά χαρακτηριστικά που έχουν υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας (h^2). Επιλογή με κριτήριο τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά, όπως η φωτοσύνθεση, μπορούν να αυξήσουν την απόδοση γρηγορότερα και πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την άμεση επιλογή για απόδοση (Hageman, 1988).

1.4 Θρέψη του καλαμποκιού

Το καλαμπόκι έχει μεγάλες απαιτήσεις σε θρεπτικά στοιχεία και ειδικά σε N, P, K, Ca, Mg, και S. Το άζωτο που δίνεται σήμερα συνολικά είναι περισσότερο από 20kg/στρ. Το Ινστιτούτο Σιτηρών για τα υψηλοαποδοτικά υβρίδια συνιστά 25-30kg/στρ., μισά ως

βασική και μισά ως επιφανειακή όταν τα φυτά γίνουν 40-60 cm. Η περίσσεια N προκαλεί μερική ωψίμηση αλλά και αύξηση των αποδόσεων. Όμως και η έλλειψη N προκαλεί ωψίμηση γιατί παρακωλύεται η ανάπτυξη τους ιδίως με συνθήκες ξηρασίας (όπως συμβαίνει συνήθως στην Ελλάδα τους καλοκαιρινούς μήνες) που δυσχεραίνουν την πρόσληψη N. Αύξηση N, αυξάνει την πρωτεΐνη του καρπού, ενώ αύξηση του πληθυσμού των φυτών ως ένα σημείο την μειώνει. Το N αυξάνει την πολυδημία, το μέγεθος και τις σειρές του σπάδικα (Γαλανοπούλου, I, 1995).

Ορισμένα υβρίδια καλαμποκιού είναι πιο παραγωγικά σε γόνιμα εδάφη ενώ άλλα πιο παραγωγικά σε φτωχά εδάφη. Στα πρώτα χρόνια της καλλιέργειας του καλαμποκιού, η επιλογή γινόταν ανάλογα με την προσαρμοστικότητά του στη γονιμότητα του εδάφους. Καθώς όμως αυξήθηκαν οι γνώσεις όσον αφορά την λίπανση και μειώθηκε το κόστος αγοράς λιπασμάτων, αντί να επιλέγουμε το υβρίδιο ανάλογα με την γονιμότητα του εδάφους, διορθώνουμε το έδαφος προσθέτοντας τα θρεπτικά στοιχεία που του λείπουν. Επειδή όμως το κόστος των λιπασμάτων άρχισε πάλι να αυξάνεται, θα πρέπει να επιλέξουμε γενοτύπους που χρησιμοποιούν πιο αποτελεσματικά τα θρεπτικά στοιχεία του εδάφους (Καλτσίκης, 1992). Στη σημερινή γεωργία είναι επιθυμητά υβρίδια που θα έχουν μειωμένες απαιτήσεις σε θρεπτικά στοιχεία, ώστε να έχουν μειωμένες εισροές λιπασμάτων αλλά παραγωγή ποιοτικά και ποσοτικά υψηλή. Το Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, ασχολείται με την επιλογή του καλαμποκιού για ανθεκτικότητα στις διάφορες αντιξοότητες (Stress breeding). Συγκεκριμένα έχει μελετηθεί ως συνδυασμένη αξιολόγηση S_0 γενοτύπων με βάση την συμπεριφορά των τριών τύπων απογόνων

$S_1/HS/TC$, των δύο τύπων απογόνων S_1/HS , S_1/TC , HS/TC , αλλά και ατομικά των τριών τύπων απογόνων S_1 , HS και TC . Σκοπός αυτής της ερευνητικής δραστηριότητας είναι η επιλογή γενότυπων που θα χρειάζονται λιγότερο άζωτο για την ανάπτυξη τους, διατηρώντας υψηλό παραγωγικό δυναμικό. Μπορεί να είναι γενότυποι που αξιοποιούν πιο αποτελεσματικά το προσλαμβανόμενο άζωτο ή γενότυποι που αποδίδουν με λιγότερο άζωτο. Επίσης γενότυποι που μπορούν να αναπτυχθούν σε συνθήκες με χαμηλότερες θερμοκρασίες από τις κανονικές. Ομοίως γενότυποι που θα μπορούσαν να αναπτυχθούν ή να αποφεύγουν τις συνέπειες από υψηλές θερμοκρασίες (θερμοπληξία, καύσωνες). Τέλος γενότυποι που θα αποδίδουν σε αλατούχα εδάφη ή σε εδάφη με βαρέα (τοξικά) μέταλλα.

1.4 Αζωτούχος λίπανση καλαμποκιού

Η βιβλιογραφία για την σημασία της αζωτούχου λίπανσης για την οικονομία και το περιβάλλον είναι ογκώδης. Όμως στη σύγχρονη γεωργία πρέπει να βρεθεί ένας νέος τρόπος διαχείρισης του αζώτου στις καλλιέργειες και ειδικά στο καλαμπόκι λόγω της ρύπανσης με την αύξηση των νιτρικών στα υπόγεια νερά και την αύξηση της τιμής των λιπασμάτων (Blackmer et al, 1994). Ο έλεγχος των νιτρικών στα φύλλα δεν είναι ευρέως χρησιμοποιημένος ώστε να γίνεται η κατάλληλη λίπανση και να αποφεύγεται η υπερβολή, γιατί είναι πιο εύκολο και ίσως πιο οικονομικό να δίνονται μεγάλες ποσότητες λιπασμάτων. Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις των αζωτούχων λιπασμάτων απαιτούν να βελτιώσουν οι παραγωγοί την διαχείριση του N, ώστε να μειωθεί η έκπλυση των νιτρικών. Η χρήση των λιπασμάτων όσο

χρειάζεται και όχι σαν συνολικό ποσό (εφάπαξ ποσό), έχει πολλά περιβαλλοντικά και οικονομικά πλεονεκτήματα (Schepers et al, 1992).

Έχουν βρεθεί διάφοροι τρόποι υπολογισμού του διαθέσιμου αζώτου, όπως το χλωροφυλλόμετρο Minolta SPAD 502, το σπεκτροραδιόμετρο, το φωτομετρικό κύτταρο, ο αεριοφωτογράφος και άλλα. Οι παραπάνω μέθοδοι θέλουν πιο πολύ χρόνο, εξειδίκευση, εξέταση στο εργαστήριο και με κομμένους φυτικούς ιστούς που ενέχουν τον κίνδυνο της οξείδωσης, σε αντίθεση με τους ζωντανούς ιστούς (φύλλα) στις μετρήσεις με το χλωροφυλλόμετρο (Blackmer et al, 1994).

Η χρήση των χλωροφυλλομέτρων προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα κατά την διαδικασία ελέγχου συμβατικών ιστών (φύλλα) για ανίχνευση τροφοπενίας N. Τα πιο εμφανή πλεονεκτήματα είναι ότι είναι φορητό και η γρήγορη εκτίμηση των επιπέδων N στο χωράφι νωρίς χωρίς την καταστροφή των φυτικών ιστών. Με την πρακτική σημασία το χλωροφυλλόμετρο φάνηκε να είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την αναγνώριση θέσεων στο χωράφι που έχουν ή όχι περίσσεια N. Τα χλωροφυλλόμετρα φαίνεται επίσης να είναι αποτελεσματικά στην διάκριση των ποσοτήτων κατά τη διάρκεια των παραγωγικών σταδίων της ανάπτυξης του καλαμποκιού. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί αυτό το εργαλείο ώστε να αναγνωρίζονται οι θέσεις όπου είναι ευαίσθητες και αντιδρούν στα αζωτούχα λιπάσματα και να προστίθενται όπου χρειάζεται με την υδρολίπανση. Η χρήση αυτή προσφέρει οικονομικά και περιβαλλοντικά πλεονεκτήματα, μειώνοντας ταυτόχρονα το ρίσκο στους παραγωγούς για μείωση της απόδοσης. Η αξία των

χλωροφυλλομέτρων μπορεί να μην είναι πρακτική, γιατί οι γενότυποι καλαμποκιού έχουν διαφορετικό, χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα φύλλων. Βέβαια μπορούν να γίνουν οι μετρήσεις ώστε να στανταριστεί ο έλεγχος για τους διάφορους γενοτύπους, περιοχές και στάδιο ανάπτυξης (Schepers et al, 1992).

Ένα πιθανό πρόβλημα με την χρήση των χλωροφυλλομέτρων είναι η επίδραση της πυκνότητας των φυτών εντός της αυλακιάς στην ακρίβεια των εκτιμήσεων. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα ποσά N στο φύλλο δεν επηρεάστηκαν από τις αποστάσεις των φυτών, αλλά οι μετρήσεις χλωροφύλλης και η απόδοση ανά φυτό αυξάνονται όσο μειώνεται ο ανταγωνισμός των φυτών και όσο αυξάνεται ο βαθμός αζωτούχου λιπάσματος. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η χρήση φυτών πλήρως ανταγωνιστικών, μπορούν να βελτιώσουν την ακρίβεια των εκτιμήσεων όταν χρησιμοποιούνται χλωροφυλλόμετρα για την εκτίμηση της περιεκτικότητας των NO_3 στο καλαμπόκι (Blackmer et al, 1993).

Στην εργασία των Marquard και Tipton (1987) έγινε έλεγχος της συσχέτισης των μετρήσεων SPAD και της συγκέντρωσης χλωροφύλλης στο φύλλο. Η χλωροφύλλη εξάχθηκε με την N,N,-διμεθυλοφορμαμίδη. Τα 12 είδη που μελετήθηκαν ήταν τα: φασόλια, λάχανο, βαμβάκι, πεκάν, σόργο, σπανάκι, ηλίανθος, περικοκλάδα, νεροκάρδαμο, μπιζέλι, ραπανάκι και κολοκύθι. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) ήταν μεγάλος (αν σκεφτούμε και απώλειες κατά την εξαγωγή της χλωροφύλλης) και κυμαινόταν από 0.827 έως 0.973. Την μέγιστη τιμή την είχε το σόργο, όπου είναι και συγγενή με το καλαμπόκι (Marquard et al, 1987).

2. Η βελτίωση του καλαμποκιού με έμμεση επιλογή βασίζεται σε φυσιολογικά χαρακτηριστικά.

Η βελτίωση του καλαμποκιού για απόδοση τις τελευταίες 5 δεκαετίες, είχε παράλληλα ως αποτέλεσμα την αύξηση των γνώσεων της φυσιολογίας του φυτού, αλλά παρόλα αυτά καμία συγκεκριμένη σχέση μεταξύ συγκεκριμένων λειτουργιών και της απόδοσης δεν έχει βρεθεί. Η απόδοση είναι ένα σύνθετο χαρακτηριστικό. Είναι το άθροισμα φυσιολογικών διαδικασιών κάτω από την επίδραση του περιβάλλοντος, ώστε να είναι αποδέκτης όλων των περιβαλλοντικών επιδράσεων πάνω στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Είναι απίθανο ένα απλό χαρακτηριστικό ή ομάδα λίγων χαρακτηριστικών να αντικαταστήσει την απόδοση σαν κριτήριο άμεσης επιλογής (Bramel-Cox, et al., 1991). Η γενετική βελτίωση της απόδοσης του καλαμποκιού είναι το αποτέλεσμα της επιλογής για απόδοση *per se*. Η ανάγκη να κατανοηθεί η σχέση μεταξύ διαδικασιών στο φύλλο, οργανιδίων, κυττάρων, και μεταξύ μοριακού επιπέδου και απόδοσης, είναι τώρα μεγαλύτερη από ποτέ. Κατ' αρχήν υπάρχει η ανάγκη να βελτιώσουμε αποτελεσματικά την διαχείριση και παραγωγή του καλαμποκιού, στο φως των σύγχρονων οικονομικών συνθηκών και των περιβαλλοντικών ανησυχιών, ειδικότερα τώρα που υπάρχει η απεριόριστη ικανότητα της μεταφοράς γονιδίων, μεταξύ και εντός των φυτικών ειδών (Tollenaar et al., 1992).

Η πρόβλεψη της γενοτυπικής αξίας των S_0 γενοτύπων και η συμπεριφορά τους ως καθαρές σειρές (S_6) σε διασταυρώσεις (υβρίδια), είναι μεγάλο ρίσκο για τα βελτιωτικά προγράμματα και επιτυγχάνεται με τη χρήση διάφορων μορφών της πρώιμης αξιολόγησης. Η φιλοσοφία της πρώιμης αξιολόγησης είναι ότι η

επιλογή για δύο με τρεις γενιές πριν τον σχηματισμό υβριδίων δεν αλλάζει την συνδυαστική ικανότητα τους. Έτσι οι βελτιωτές συνεχίζουν την βελτίωση μετά την S_4 γενιά σκοπεύοντας να εξασφαλίσουν καθαρές σειρές καλύτερες του μέσου όρου. Βέβαια ο πληθυσμός που χρησιμοποιείται είναι επίσης αποφασιστικός παράγοντας. Αν ο πληθυσμός είναι ήδη βελτιωμένος, παραπέρα βελτίωση δεν θα έχει κάποιο κέρδος επιπλέον και η πρώιμη αξιολόγηση είναι εφικτή. Αντίθετα εάν ο πληθυσμός είναι μη βελτιωμένος, η επιλογή κατά τη διάρκεια δύο με τρεις γενιές αυτογονιμοποίησης, είναι χρήσιμη για την επιλογή συγκεκριμένων αγρονομικών χαρακτηριστικών και η εκτίμηση του υβριδίου θα είναι εφικτή στην S_4 γενιά (Hallauer et al., 1988). Οι διάφοροι μέθοδοι επαναλαμβανόμενης επιλογής αποτελούν μία λογική συνέχεια των μεθόδων πρώιμης αξιολόγησης, ιδιαίτερα η αμοιβαία επαναλαμβανόμενη επιλογή με δοκιμαστή καθαρή σειρά (Καλτσίκης, 1989).

Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν την χρήση των φυσιολογικών χαρακτηριστικών ως έμμεσων κριτηρίων επιλογής για την παραγωγικότητα των δημητριακών. Οι μεταβολικές διαδικασίες χρειάζονται λιγότερο χρόνο για επιλογή κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, από την επιλογή με κριτήριο την απόδοση. Είναι γνωστό ότι η επιλογή μόνο για απόδοση, κάτω από αντίξοες συνθήκες, είναι ανεπαρκής λόγω της υψηλής παραλλακτικότητας και της χαμηλής κληρονομικότητας. Το ενδιαφέρον σε ένα πρόγραμμα επιλογής φυσιολογικών χαρακτηριστικών βασίζεται στην επιθυμία για: 1) την αποφυγή της υψηλής αλληλεπίδρασης του περιβάλλοντος με τον γενότυπο και την χαμηλή κληρονομικότητα και 2) την κατανόηση και βελτίωση των

διαδικασιών. Όμως, τα απλά φυσιολογικά χαρακτηριστικά που μετρώνται κατά την διάρκεια του βλαστικού κύκλου, δεν παρέχουν ακριβείς εκτιμήσεις για το τελικό προϊόν όπως η απόδοση (Bramel-Cox et al., 1991).

Η χρησιμοποίηση δευτερευόντων χαρακτηριστικών ως κριτηρίων έμμεσης επιλογής για βελτίωση της απόδοσης είναι αποτελεσματική εφόσον αυτά έχουν μεγάλη γενοτυπική συσχέτιση με την απόδοση, υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας, μπορούν να μετρηθούν ευκολότερα και επηρεάζονται από το περιβάλλον λιγότερο από ότι η απόδοση (Lonnquist, 1967). Η απόδοση παραμένει το βασικό κριτήριο επιλογής, αλλά συνεκτιμάται με τα συσχετιζόμενα χαρακτηριστικά (Falconer, 1960). Δευτερεύοντα χαρακτηριστικά ως μοναδικά κριτήρια επιλογής δεν ήταν αποτελεσματικά ως προς την βελτίωση της απόδοσης (Hageman et al., 1988; Bramel-Cox et al., 1989). Πρόσφατα η εκτίμηση του Leaf Greenness, δηλαδή η ένταση του πράσινου χρώματος των φύλλων (LG), έδωσε ενθαρρυντικά στοιχεία για την καλλιεργητική πρακτική του καλαμποκιού (fertigation) (Blackmer et al., 1995).

Η χρήση χαρακτηριστικών συνδεδεμένων με την απόδοση είναι επιθυμητή. Η προσπάθεια έγκειται στην ανάπτυξη μεθοδολογίας βελτίωσης με συνδυασμό των συμβατικών και σύγχρονων τεχνικών με έμφαση σε: α) έλεγχο των ομομεικτικών και ετερωτικών φαινομένων στην απόδοση σε πληθυσμό καλαμποκιού χρησιμοποιώντας απογονικούς τύπους, και την *per se* έκφραση τους, που θα αποδίδουν αποτελεσματικά την πρώιμη αξιολόγηση, β) μελέτη του χαρακτηριστικού ένταση του πράσινου χρώματος των φύλλων, δηλαδή η χλωροφύλλη (leaf greenness, LG) και της πιθανότητας να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο έμμεσης

επιλογής γ) αναγνώριση και σύγκριση γονιδίων με την τεχνική του PCR.

Σε μία πρώτη προσέγγιση του εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μελετήθηκε και μελετάται η δυνατότητα της χρήσης του LG σαν ένα φυσιολογικό χαρακτηριστικό για έμμεση επιλογή. Οι Goulas et al (1997) και Λαζάρου κ.α. (1996) παρουσίασαν δεδομένα που δείχνουν ότι η ένταση του πράσινου χρώματος των φύλλων (LG) έχει υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας μόνο στις S_1 οικογένειες και πολύ χαμηλό έως πρακτικά μηδέν στους άλλους δύο τύπους οικογενειών (HS και TC). Περαιτέρω στοιχεία (Γούλας κ.α., 1994) έδειξαν ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ καθαρών σειρών.

Οι αναλύσεις για την περιεκτικότητα και τη συγκέντρωση του οργανικού N (ως μεταβολίτη) στα φύλλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χαρακτηριστικό για επιλογή. Παρόλα αυτά υπάρχει γενετική διαφορά στην περιεκτικότητα και συγκέντρωση του N στο φύλλο μεταξύ των γενοτύπων καλαμποκιού και αυτά τα χαρακτηριστικά είναι κληρονομούμενα, αλλά η χρήση αυτών είναι περιορισμένη. Μερικοί λόγοι που το N επηρεάζει την απόδοση είναι: α) μεγάλα ποσά N, μέσα στα όρια, συνδέονται με αυξήσεις των φύλλων, του βάρους, των καρβοξυλάσεων και της χλωροφύλλης, β) οι συγκεντρώσεις N και η φωτοσυνθετική ικανότητα έχει συσχετιστεί θετικά, γ) οι συγκεντρώσεις των φύλλων με N (2.9% στο φύλλο του σπάδικα στο στάδιο του μεταξιού) συσχετίζεται με την απόδοση του σπόρου, δ) η επιπλέον αζωτούχα λίπανση συχνά βασίζεται στις αναλύσεις φύλλων για N ε) η επανεκκίνηση του N των φύλλων (κατά τον γενετικά φυσιολογικό γηρασμό) δίνει N για την φυσιολογική αύξηση ανάπτυξη του ενδοσπερμίου. Οι γνώσεις της

αλληλεπίδρασης των μεταβλητών επιπέδων N στα φύλλα και άλλων μεταβολικών δραστηριοτήτων σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης των φυτών, δεν υπάρχει (Hageman et al, 1988).

Η χρήση των φυσιολογικών χαρακτηριστικών στη βελτίωση του καλαμποκιού έχει κάποιες δυσκολίες και τα κυριότερα προβλήματα είναι: 1) δεν βρέθηκε κανένα απλό χαρακτηριστικό που να έχει μία υψηλή, θετική συσχέτιση με την απόδοση, 2) όταν χρησιμοποιούνται ένζυμα ή ενζυμικά συστήματα ως κριτήρια επιλογής, η δραστηριότητα *in vitro* μάλλον δεν αντικατοπτρίζει πλήρως τη δραστηριότητα τους στο χωράφι. Ένα ένζυμο δεν μπορεί να εκτιμήσει το τελικό προϊόν που σχηματίζεται με την πάροδο του χρόνου (καλλιεργητική περίοδο). Εξαίρεση πιθανών, να είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στα τελικά στάδια του προϊόντος. 3) η επίδραση του περιβάλλοντος που επηρεάζει την απόδοση είναι τόσο πολύπλοκη που η επίδραση ενός απλού ενζύμου ή της ενζυματικής δραστηριότητας, είναι ασαφής, 4) ο υπολογισμός των φυσιολογικών χαρακτηριστικών γίνεται συνήθως στο εργαστήριο και έχει υψηλό κόστος (Hageman et al, 1988).

Το LG εκτιμάται από την συγκέντρωση του φύλλου σε χλωροφύλλη, με το χλωροφυλλόμετρο Minolta SPAD 502. Η εκτίμηση έγινε κάτω από στρες N ώστε να φανούν διαφορές στα ποσά N των φύλλων και κατά συνέπεια τα ποσά απορρόφησης N από το έδαφος. Η συγκέντρωση χλωροφύλλης στο καλαμπόκι βρέθηκε να έχει μεγάλη συσχέτιση με το N των φύλλων και την επάρκεια σε N. Έτσι η χλωροφύλλη στο φύλλο αντικατοπτρίζει το επίπεδο N στο φύλλο και το επίπεδο απόδοσης. Το χλωροφυλλόμετρο SPAD 502, φαίνεται να εκτιμά αξιόπιστα τις συγκεντρώσεις χλωροφύλλης στο φύλλο και επομένως είναι ένα

υποσχόμενο εργαλείο για την εκτίμηση των επιπέδων N στην καλλιέργεια κατά την καλλιεργητική περίοδο. Για την μέτρηση των σχετικών συγκεντρώσεων χλωροφύλλης, το χλωροφυλλόμετρο κλείνει στο φύλλο του καλαμποκιού και αμέσως φως περνά διαμέσου του φύλλου στα 650 και 940nm (εικόνα 1). Η μετάδοση φωτός στα 940nm χρησιμοποιείται ως βοήθημα ώστε να αντισταθμιστούν παράγοντες όπως η σπαργή των φύλλων και η πυκνότητά του, επειδή η πηγή των 650nm είναι ευαίσθητη στη συγκέντρωση χλωροφύλλης. Οι μετρήσεις που δίνονται δείχνουν τις σχετικές συγκεντρώσεις χλωροφύλλης (Blackmer et al, 1995).

Υψηλά επίπεδα του διαθέσιμου N στο έδαφος, έχει ως αποτέλεσμα μεγάλη κατανάλωση NO_3 , αλλά αυτό δεν αυξάνει τις τιμές SPAD του χλωροφυλλόμετρου. Δηλαδή δεν διαφοροποιεί τις μετρήσεις σε υψηλές περιεκτικότητες θρεπτικών, παρά μόνο σε αντίξοες συνθήκες. Έτσι η επιπλέον κατανάλωση δεν αναγνωρίζεται από το χλωροφυλλόμετρο, αλλά το κάνει ιδανικό για την ανίχνευση τροφοπενίας N. Τα φυτά μεταχειρίστηκαν το ίδιο εκτός από την διαθεσιμότητα του N και θα πρέπει να δείχνουν διαφορές όπου υπάρχει τροφοπενία. Επειδή τα χλωροφυλλόμετρα δεν είναι ευαίσθητα σε υψηλή συγκέντρωση αζώτου, δεν είναι γνωστό το ακριβές επίπεδο από τις απαιτήσεις σε N για μέγιστη απόδοση. Αν αναγνωριστεί κάποια έλλειψη μπορεί να δοθεί το λίπασμα με υδρολίπανση. Αυτή η στρατηγική επιτρέπει να δίνεται λίπανση μόνο όταν χρειάζεται η καλλιέργεια. Αυτή η προσέγγιση στην διαχείριση του N εξηγεί την διακύμανση των αποτελεσμάτων, στην εποχιακή διαθεσιμότητα N, από παραμέτρους δύσκολους να υπολογιστούν πριν την βλαστική περίοδο, όπως είναι η έκπλυση και η απορρόφηση από ορυκτά. Βέβαια αυτή η μέθοδος πρέπει να

εφαρμοσεί αρκετά νωρίς, ώστε να μην μειωθεί το δυναμικό της απόδοσης (Blackmer et al, 1995).

3. Συσχέτιση του LG και μοριακών δεικτών

Οι αερόβιοι οργανισμοί λειτουργούν και παίρνουν ενέργεια, χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο (O_2) στην αναπνοή. Εντούτοις η παρουσία του ατομικού οξυγόνου στα κύτταρα, κουβαλά και κάποιο δυνητικό φυσιολογικό κόστος. Αν και το O_2 από μόνο του, σχετίζεται ευνοϊκά, έχει τη δυνατότητα, να μετατρέπεται μερικώς και να σχηματίζει ενεργές, τοξικές, μορφές οξυγόνου. Αυτές οι τοξικές μορφές του οξυγόνου παράγονται είτε ως παρέκκλιση των μεταβολικών διαδικασιών, είτε ως αποτέλεσμα περιβαλλοντικών εντάσεων. Οι ενεργές μορφές του O_2 περιλαμβάνουν την υπεροξειδωτική ρίζα (O_2^-), την ρίζα του υδροξυλίου ($^{\cdot}OH$) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Οι παραπάνω μορφές μπορούν να αντιδράσουν με κάποια μεγαλομόρια (πρωτείνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, DNA), μετατρέποντας ή απενεργοποιώντας τη βιοχημική τους δραστηριότητα. Οι συνδυασμένες βιολογικές επιδράσεις, από αυτές τις τοξικές μορφές στους οργανισμούς, ονομάζεται “οξειδωτικό στρες”. Για ελάττωση των δυσμενών επιδράσεων από το ενεργό οξυγόνο οι οργανισμοί περιέχουν ποικίλους ενζυμικούς και μη-ενζυμικούς μηχανισμούς, ώστε να μπορούν να μετατρέπουν το “οξειδωτικό στρες” σε ευνοϊκές μορφές οξυγόνου. Μεταξύ αυτών των μηχανισμών άμυνας, ανήκει το αντιοξειδωτικό ένζυμο καταλάση, το οποίο μετατρέπει το H_2O_2 σε O_2 και H_2O .

Σύμφωνα με τα παραπάνω, κάτω από αντίξοες συνθήκες οι οργανισμοί παράγουν τοξικές ρίζες και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η εξέταση των γενοτύπων σε όλους τους απογονικούς τύπους έγινε κάτω από στρες αζώτου. Όμως όλοι οι γενότυποι δεν έχουν την ίδια αφομοιωτική ικανότητα αζώτου με συνέπεια διαφορετικά

ποσά χλωροφύλλης στα φύλλα και άλλοι γενότυποι να παράγουν πολλά και άλλοι λίγα ποσά ελεύθερων ριζών και H_2O_2 . Το ερώτημα που τίθεται είναι εάν οι γενότυποι που αντιδρούν πιο ευνοϊκά στο στρες αζώτου, έχουν και διαφορές στο μόριο της καταλάσης, δηλαδή διαφορετικό Μοριακό Βάρος, είτε μικρότερο είτε μεγαλύτερο.

4. Σκοπός

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν α) να μελετηθεί η συμπεριφορά S_0 γενοτύπων ως προς το LG σε συνθήκες θαλάμου ανάπτυξης και αγρού και β) να γίνει μία προσπάθεια μοριακής ανάλυσης με πιθανή συσχέτιση μοριακών δεικτών με το LG.

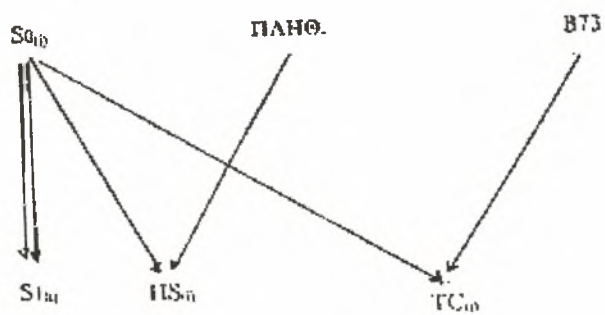
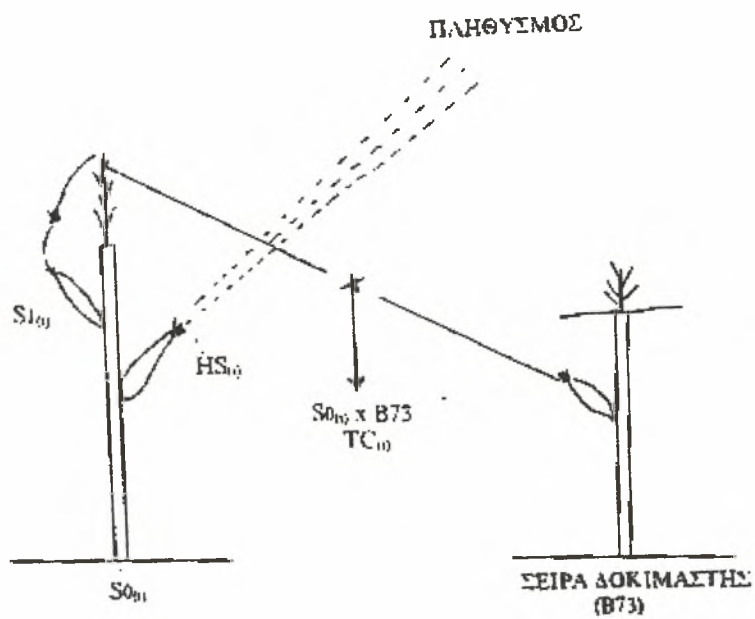
Γ. Υλικά και Μέθοδοι

1. Γενετικό υλικό

Το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία, προήλθε από το πρόγραμμα του Εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Ετήσια έκθεση προόδου, Γούλας κ.α., 1994). Κατά την διάρκεια του προγράμματος μελετήθηκε βελτιωτική μεθοδολογία βασισμένη στη συνδυασμένη αξιολόγηση τριών τύπων οικογενειών HS, S₁ και TC σε συνθήκες μειωμένης αζωτούχου λίπανσης με σκοπό τη βελτίωση του πληθυσμού και την ταυτόχρονη δημιουργία γενετικού υλικού για άμεση αξιοποίηση σε προγράμματα δημιουργίας απλών υβριδίων καλαμποκιού.

Χρησιμοποιήθηκε ο πληθυσμός καλαμποκιού GR-OP-35 δημιουργία του Ινστιτούτου Σιτηρών, Τμήμα Καλαμποκιού. Πρόκειται για πληθυσμό οδοντόμορφο και πολύδημο με ευρεία γενετική βάση. Ο πληθυσμός υπέστη τρεις γενεές Μαζικής Επιλογής για απόδοση. Κάθε ένας από τους 160 S₀ γενοτύπους αντιπροσωπεύθηκε από τρεις τύπους απογόνων: Των ετεροθαλλών (HS), των αυτογονιμοποιούμενων (S₁) και αυτών από τη διασταύρωση δοκιμής (TC) με την καθαρή σειρά B73 (S₀ x B73) (σχήμα 1).

Οι HS, S₁ και TC οικογένειες δημιουργήθηκαν όπως φαίνεται στο σχήμα 1. Το 1992 και το 1993, ο πληθυσμός σπάρθηκε στο Γενεαλογικό αγρό, σε πειραματικά τεμάχια των 4 γραμμών, εναλλάσσοντας με ένα τεμάχιο της καθαρής σειράς B73, σαν δοκιμαστής. Την εποχή της ανθοφορίας, οι σπάδικες των πολύδημων φυτών S₀ καλύφθηκαν. Οι σπάδικες των φυτών B73 καλύφθηκαν το ίδιο καλά



Σχήμα 1: Δημιουργία τύπων οικογενειών και γενετική συγγένεια μεταξύ τους.

και οι φούντες απομακρύνθηκαν πριν την άνθηση τους. Ο πρώτος σπάδικας των S_0 φυτών έμεινε καλυμμένος ώστε να αυτογονιμοποιηθεί και να παραχθεί ο σπόρος της S_1 οικογένειας, ενώ τον ίδιο χρόνο γύρη μεταφέρονταν στον σπάδικα του B73, για την παραγωγή του σπόρου της TC οικογένειας. Ο δεύτερος σπάδικας των S_0 φυτών, αφέθηκε σε ελεύθερη επικοινωνία χρησιμοποιώντας μεγάλη ποσότητα γύρης από 50 φυτά του πληθυσμού, για την παραγωγή του σπόρου της HS οικογένειας. Έτσι κάθε S_0 γενοτύπος αντιπροσωπεύθηκε από μία ομάδα τριών τύπων οικογενειών (S_1 , HS, TC). Από τα 850 φυτά του πληθυσμού που χρησιμοποιήθηκαν, μόνο 160 βρέθηκαν να έχουν ικανοποιητικό αριθμό σπόρων (ελάχιστο 200 σπόροι), για την εκτίμηση στο χωράφι όλων των τύπων οικογενειών.

Οι 160 γενότυποι αξιολογήθηκαν στο χωράφι όπου εκτιμήθηκε εμμέσως η αφομοιωτική ικανότητα σε σχέση με την θρεπτική κατάσταση των φυτών χρησιμοποιώντας μετρητή χλωροφύλλης Minolta SPAD-502 (Blackmer et al., 1995). Η εκτίμηση έγινε σε τρία στάδια που αντιστοιχούσαν σε 70, 80 και 90 ημέρες από την σπορά. Η μέτρηση έγινε στο τελευταίο πλήρως εκπτυγμένο φύλλο και στο φύλλο του σπάδικα (Ετήσια έκθεση προόδου, Γούλας κ.α., 1994).

Τα δεδομένα αναλύθηκαν σύμφωνα με το πειραματικό σχέδιο “ατελείς ομάδες” για διάφορες μεταβλητές από τις οποίες στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εκτιμήσεις τιμών SPAD. Για κάθε τύπο οικογένειας *per se* υπολογίστηκε η καμπύλη συχνοτήτων και τα χαρακτηριστικά της (μέσος όρος, διακύμανση, C.V.), (Ετήσια έκθεση προόδου, Γούλας κ.α., 1994). Εκτιμήθηκε η

Ομομεικτική εξασθένηση (Inbreeding effect) καθώς και η Ετερωτική συμπεριφορά ($HET_{(I)}$ και $HET_{(II)}$). Η εκτίμηση αυτών των παραμέτρων έγινε με βάση τους τύπους: Ομομεικτική εξασθένηση= $1-S_1/HS$, $HET_{(I)}=TC/S_1-1$ και $HET_{(II)}=TC/HS-1$, (Goulas et al., 1997).

Με βάση την *per se* συμπεριφορά για το LG (Γούλας κ.α., 1994) καθώς και την συμπεριφορά για την Ομομεικτική εξασθένηση και Ετέρωση που εκτιμήθηκε και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως επιλέχθηκαν 7 γενότυποι για το χαρακτηριστικό της έντασης του πράσινου χρώματος του φύλλου (Leaf Greenness, LG) που εμφανίζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Γενότυποι	S_1 (SPAD)	HS (SPAD)	TC (SPAD)	Ομομεικτική εξασθένηση	HET (I)	HET (II)
93/29	48	56	57	13,8	18,35	2
92/320	66	57	57	-16,2	12,8	1,3
93/202	52	57	57	11,1	20	-3
93/253	56	57	51	1,9	-8	-10
93/155	53	55	52	3,6	-0,3	-3,9
93/198	58	53	58	-10,8	-0,6	10,1
93/153	65	51	60	-27,1	-8,8	15,9

Οι 7 γενότυποι χρησιμοποιήθηκαν και για δεύτερη αξιολόγηση στο βιοκλιματικό θάλαμο για την αφομοιωτική τους ικανότητα κάτω από συνθήκες εδαφικού στρες όπου εμμέσως εκτιμάται με το χαρακτηριστικό του LG, με σκοπό να δωθεί η δυνατότητα εφαρμογής έμμεσης επιλογής με βάση το χαρακτηριστικό αυτό. Επίσης στους 7 γενοτύπους έγινε και μοριακή αξιολόγηση με την μέθοδο PCR, για να βρεθούν διαφορές

για το γονίδιο της Καταλάσης του καλαμποκιού, που πιθανών να επηρεάζουν και την διαφορετική αφομοιωτική ικανότητα.

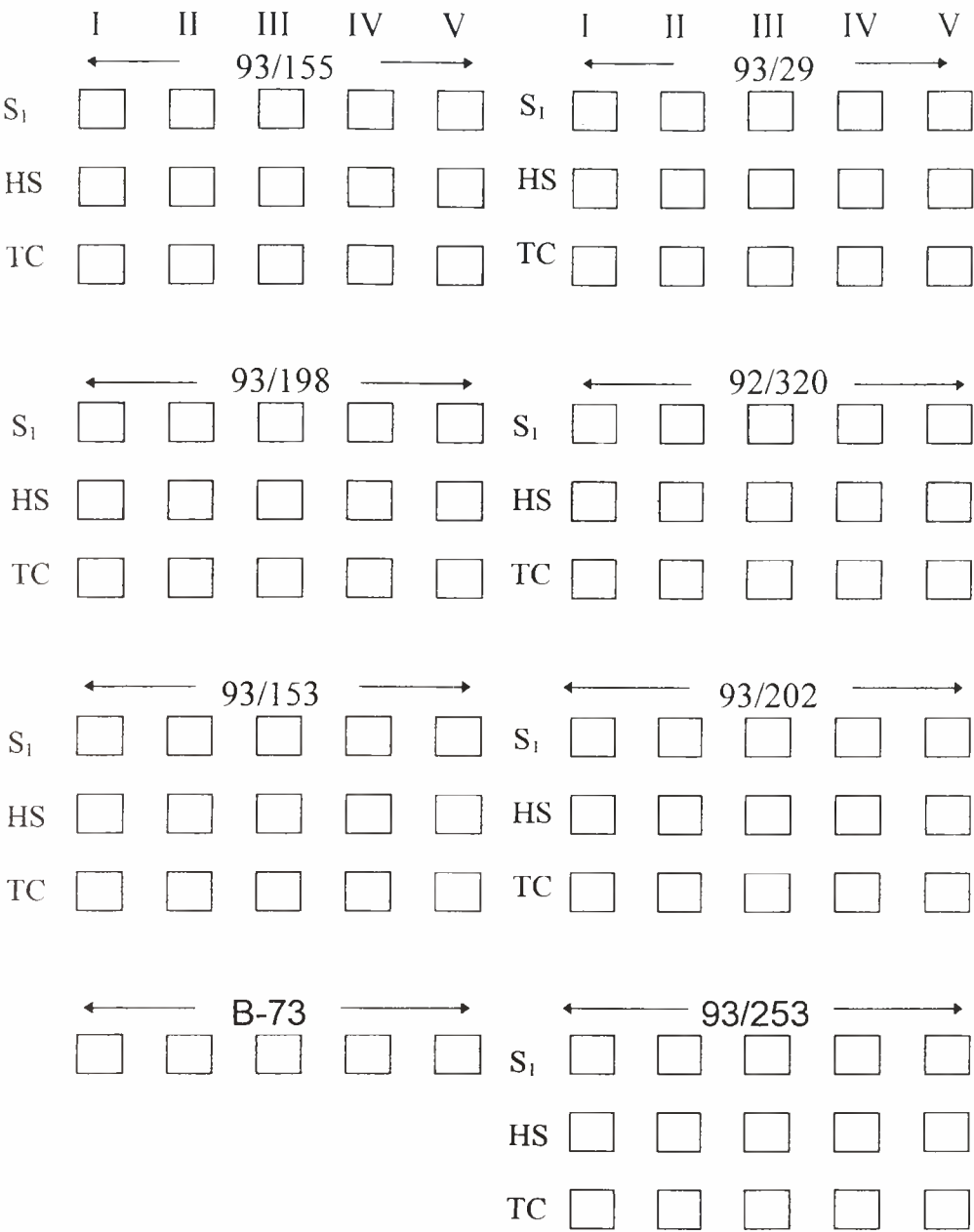
2. Συμβατική αξιολόγηση στο θάλαμο ανάπτυξης:

Κατά την συμβατική αξιολόγηση πάρθηκαν 2 μετρήσεις χλωροφύλλης και μία του ύψους φυτών στο σημείο έκπτυξης των τεσσάρων μόνιμων φύλλων. Το πείραμα έγινε στο εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης φυτών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το χρονικό διάστημα από Μάιο έως Δεκέμβριο 1996.

2.1. Πειραματική διαδικασία:

Στις 23/10 έγινε η σπορά των 7 S_0 γενοτύπων και της καθαρής σειράς B-73 ως μάρτυρα. Ο κάθε S_0 γενότυπος αντιπροσωπεύτηκε από τους 3 τύπους απογόνων S_1 , HS και TC. Χρησιμοποιήθηκε πειραματικό σχέδιο Πλήρες Ομάδες σε ελεύθερη διάταξη. Ομάδα ήταν οι επτά γενότυποι και ο μάρτυρας. Εντός κάθε ομάδας ήταν οι τρεις τύποι οικογενειών (S_1 , HS και TC). Για κάθε τύπο οικογένειας είχαμε πέντε (5) επαναλήψεις. Η επανάληψη ήταν γλάστρα με τρία φυτά (σχήμα 2). Το πείραμα έγινε σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες (βιοκλιματικός θάλαμος). Η θερμοκρασία κατά την σπορά ήταν 12°C και μετά το φύτευμα 20°C, οι οποίες είναι ιδανικές θερμοκρασίες για το φύτευμα και τη βλάστηση στις Ελληνικές συνθήκες (Σφήκας, 1991). Η ένταση του φωτός στο 1m ήταν 10Klux και η φωτοπερίοδος ήταν 16:8 (H:N). Το εδαφικό υπόστρωμα ήταν τύρφη και άμμος σε αναλογία 1:1. Δεν δόθηκε καθόλου λίπανση, ώστε να δημιουργηθούν συνθήκες στρες αζώτου στα φυτά. Σε κάθε γλάστρα σπάρθηκαν 3 σπόροι.

Δύο εβδομάδες μετά την σπορά ανέβηκε η θερμοκρασία στους 20°C. Στις 28/11 έγινε η πρώτη μέτρηση χλωροφύλλης με το χλωροφυλλόμετρο Minolta Spad 502 (σε μονάδες Spad)



Σχήμα 2: Πειραματικό σχέδιο, που χρησιμοποιήθηκε στον βιοκλιματικό θάλαμο.

Σύμφωνα με τους Blackmer, Schepers, Varnel και Walter-Shea η τεχνική του χλωροφυλλόμετρου έχει δυναμικό για γρήγορη εκτίμηση του διαθέσιμου N μετρώντας την μετάδοση του φωτός διαμέσου του φύλλου στα 450 έως 940 nm. Αυτοί οι μετρητές μπορούν να αναγνωρίσουν την έλλειψη N στο καλαμπόκι γιατί η έλλειψη N μειώνει τη χλωροφύλλη του φύλλου, η οποία με την σειρά της το ποσό του φωτός που μεταδίδεται διαμέσου του φύλλου. Τα χλωροφυλλόμετρα χρησιμοποιήθηκαν με πολλούς τρόπους και διαφορετική επιτυχία. Αυτοί οι μετρητές είναι πιο αποτελεσματικοί όταν οι μετρήσεις είναι σχετικές με αγρό που δεν έχει όρια στα ποσά N. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι δείχνει εκτιμήσεις N χωρίς χάσιμο χρόνου στις εργαστηριακές αναλύσεις. Το χλωροφυλλόμετρο επιτρέπει την ανίχνευση του μειωμένου N σε 30 φύλλα στη σειρά σε λίγα λεπτά, συνδέοντας την μέτρηση από τα ίδια τα φυτά και καταγράφοντας τον μέσο όρο (Peterson et al., 1993), εικόνα 1.

Τέλος μετά την έκπτυξη του τετάρτου μόνιμου φύλλου στις 19/12 έγινε η δεύτερη μέτρηση χλωροφύλλης και ύψος έκπτυξης του τετάρτου μόνιμου φύλλου.



Εικόνα 1: Το χλωροφυλλόμετρο Minolta SPAD 502.

2.2. Ανάλυση - Επεξεργασία δεδομένων:

Για την επεξεργασία των δεδομένων εκτιμήθηκε η Διακύμανση μεταξύ τύπων οικογενειών για κάθε ένα από τους επτά S_0 γενοτύπους και το εντός των οικογενειών διακύμανση (Πειραματικό σφάλμα). Έγινε επίσης και εκτίμηση της διακύμανσης μεταξύ S_1 , HS και TC *per se* για τους επτά γενοτύπους. Η επεξεργασία έγινε στο πρόγραμμα MSTATc Έγινε ανάλυση παραλλακτικότητας με το υποπρόγραμμα ANOVA-2.

3. Μοριακή αξιολόγηση:

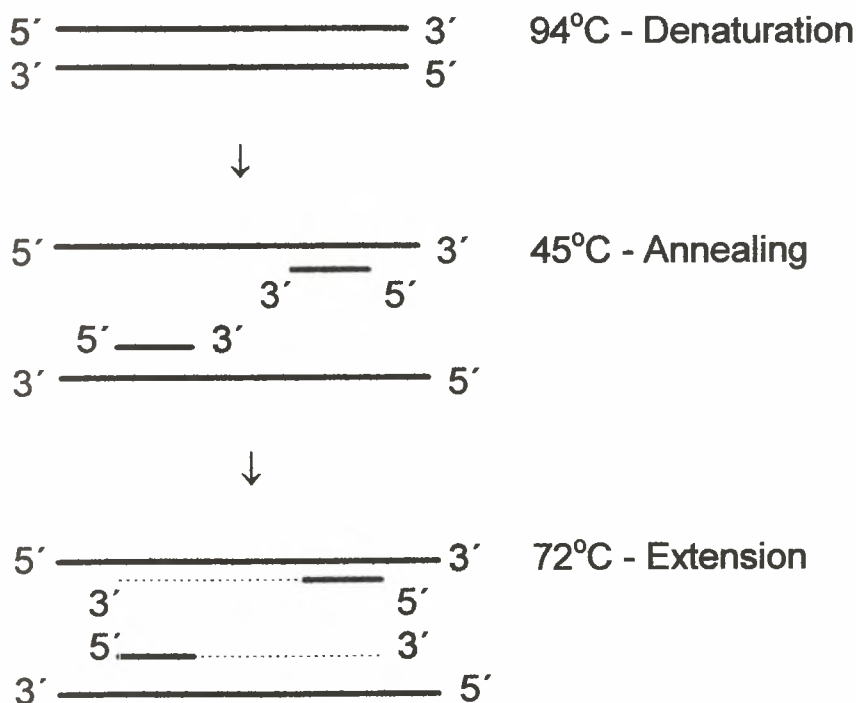
Η μοριακή αξιολόγηση απέβλεπε στην σύγκριση του γονιδίου της Καταλάσης των 7 S₀ οικογενειών (των απογόνων τους) και της καθαρής σειράς B-73. Η Καταλάση είναι το ένζυμο που προστατεύει τα κύτταρα από την οξειδωτική δράση των ελεύθερων ριζών (O₂⁻, ⁻OH) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) (Scandalios, 1991).

3.1. Θεωρία:

Κατά την μοριακή αξιολόγηση, πραγματοποιήθηκε η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) στον θερμοκυκλοποιητή Biometra και στη συνέχεια με την συσκευή Ηλεκτροφόρησης σε gel αгарόζης και υπεριώδη ακτινοβολία (U.V.) είδαμε τα αποτελέσματα (εικόνες 2-8).

Η όλη διαδικασία βασίζεται στα εξής: παίρνοντας ένα μικρό, τρυφερό κομμάτι φυτικού ιστού και με τη χρήση κάποιων ρυθμιστικών διαλυμάτων, απομονώσαμε ολικό DNA. Ένα μέρος αυτού -το οποίο ονομάζεται Target DNA- στη συνέχεια τοποθετήθηκε μαζί με το ένζυμο Taq polymerase (από το βακτήριο *Thermofilus aquaticus*), τα Primers (εναρκτήριο εικοσαμερές κομμάτι DNA - upstream και downstream) και τα ολιγονουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP και dTTP) στον θερμοκυκλοποιητή όπου έγινε η αντίδραση. Στον θερμοκυκλοποιητή αρχικά η θερμοκρασία στους 94°C ανάγκασε τις αλυσίδες του DNA να ανοίξουν για να χρησιμοποιηθούν αργότερα ως εκμαγείο στη σύνθεση του γονιδίου (Denaturation), σχήμα 3. Στη συνέχεια η θερμοκρασία κατέβηκε στους 42°C και τα primers υβριδίστηκαν και κόλλησαν το μεν upstream στο τέλος του γονιδίου της καταλάσης που βρίσκεται

στην κωδικοποιούσα αλυσίδα DNA, το δε downstream στο τέλος του γονιδίου της συμπληρωματικής αλυσίδας του Target DNA (Annealing), σχήμα 3. Μετά η θερμοκρασία ανέβηκε στους 72°C όπου το ένζυμο Taq πολυμεράση ένωσε τα ολιγονουκλεοτίδια στη σειρά, με φορά 5'→3' στο τέλος των primers χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τις αλυσίδες DNA (Extension), σχήμα 3. Η δράση και κατά συνέπεια το μήκος του σχηματισμένου κομματιού εξαρτάται από την διάρκεια που μένει η θερμοκρασία στους 72°C. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 40 φορές (40 κύκλοι). Έτσι στο τέλος το αρχικό DNA είχε πολλαπλασιαστεί με γεωμετρική πρόοδο 2^{40} φορές.



Σχήμα 3: Η διαδικασία Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.

Μόλις τελείωσε ο πολλαπλασιασμός, λήφθηκε το DNA και τοποθετήθηκε στην συσκευή Ηλεκτροφόρησης. Η Ηλεκτροφόρηση λειτούργησε με gel αгарόζης (1,5%) και Βρωμιούχο Αιθίδιο. Το

βρωμιούχο αιθίδιο δεσμεύεται από τις αλυσίδες του DNA και φωσφορίζει κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (U.V.). Έτσι τα τμήματα του DNA γίνονται ορατά και μπορούμε να τα μελετήσουμε. Με την βοήθεια κάποιων ειδικών “χτενών”, πριν πήξει η αγαρόζη δημιουργούσαμε τις εσοχές για το πολλαπλασιασμένο DNA, εικόνα 6. Με τον τροφοδότη (EC-3000-90), τέθηκε σε λειτουργία η Ηλεκτροφόρηση. Στην συνέχεια το gel μεταφέρθηκε στην συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (U.V.) για να φανεί η μπάντα του γονιδίου και να φωτογραφηθεί.

3.2. Πειραματική διαδικασία:

Μετά το φύτευμα, πάρθηκε φυτικός ιστός για εξαγωγή και απομόνωση DNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase change reaction, PCR) στον θερμοκυκλοποιητή Biometra, και τέλος στη συσκευή Ηλεκτροφόρησης, με gel αγαρόζης.

Για την εξαγωγή DNA χρησιμοποιήθηκαν 0.1gr φυτικού ιστού. Ο φυτικός ιστός μετά τον τεμαχισμό του τοποθετήθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα του 1.7ml, εικόνα 2, μαζί με 700μl διαλύματος εξαγωγής DNA, 100μl μερκαπτεθανόλη και 100μl CTAB. Το διάλυμα εξαγωγής περιέχει 100mM Tris (pH=7.5), 2% PVPP, 50 mM EDTA και 1.5M NaCl. Το EDTA δεσμεύει τα ιόντα Mg^{+2} ώστε να αποτρέψει τις DNA-άσες να καταστρέψουν το DNA. Το CTAB δημιουργεί σύμπλοκα με πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Στον μικροφυγοκεντρικό σωλήνα έγινε ομογενοποίηση των παραπάνω συστατικών και μετά αυτός τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο στους 60°C για 30min, εικόνα 3. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με χλωροφόρμιο 700μl και κατόπιν φυγοκέντρωση στα

13000rpm για 10min μετά το πέρας της πλύσης κάθε φορά, εικόνα 3. Προστέθηκε 1/10 του όγκου CTAB 10% και τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο στους 60°C για 15min. Συμπληρώθηκε έως τα 1.7ml με TE buffer και αφέθηκε άλλα 15min στο υδατόλουτρο. Ακολούθησε φυγοκέντριση στα 14000rpm για 20min και το υπερκείμενο διάλυμα χύθηκε. Το ίζημα αραιώθηκε με 100μl TE buffer. Κατόπιν έγινε καθίζηση με αιθανόλη -20°C. Προστέθηκε 1/10 του όγκου NaCl, με 2.5 τουλάχιστον όγκους κρύας αιθανόλης -20°C. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους -20°C για τουλάχιστον μία ώρα. Μετά ακολούθησε φυγοκέντριση στα 14000rpm για 20min και χύθηκε το υπερκείμενο. Κατόπιν στο ίζημα προστέθηκαν 500μl κρύας αιθανόλης για να δεσμευτούν τα μόρια του νερού. Ξαναχύθηκε το υπερκείμενο και αναποδογυρίστηκαν οι μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες σε διηθητικό χαρτί ώστε να στεγνώσει το ίζημα. Τέλος το ίζημα διαλύθηκε σε 200μl TE buffer. Το τελικό διάλυμα περιείχε καθαρό DNA (Target DNA).

Αφού έγινε η απομόνωση του DNA, ακολούθησε η διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, P.C.R.). Κάθε μικροφυγοκεντρικός σωλήνας των 0.6ml περιείχε, 2μl target DNA, 2.5μl 10×PCR buffer, 12μl νερό, 1μl up-stream primer, 1μl down-stream primer, 3.8μl MgCl₂, 2.5μl dNTPs και τέλος 0.2μl Taq Polymerase. Ο συνολικός όγκος του διαλύματος ήταν 25μl και προστέθηκε μία σταγόνα μεταλλικού λαδιού για να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύματος, κατά τις μεταβολές της θερμοκρασίας στον θερμοκυκλοποιητή, εικόνα 4, καθώς γινόταν η αντίδραση. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν στις ειδικές υποδοχές του θερμοκυκλοποιητή.

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν κατά τον πολλαπλασιασμό ήταν τα εξής:

- * Στάδιο 0 94°C 3min
- * Στάδιο 1 94°C 30sec
- * Στάδιο 2 42°C 30sec
- * Στάδιο 3 72°C 1min
- * Στάδιο 4 72°C 5min
- * Στάδιο 5 4°C 20min

Τα στάδια από 1 έως 3 πραγματοποιήθηκαν σε 40 κύκλους.

Στο στάδιο 1, στους 94°C, ανοίγουν οι αλυσίδες του DNA (Denaturation). Στο στάδιο 2, στους 42°C, τα primer (up & down) υβριδίζονται στις αντίστοιχες συμπληρωματικές θέσεις τους πάνω στην αλυσίδα του target DNA (Annealing). Στο στάδιο 3 στους 72°C, δρα η Taq-Polymerase η οποία χρησιμοποιώντας το Target DNA ως εκμαγείο, ενώνει dNTPs και συνθέτει το γονίδιο της καταλάσης.

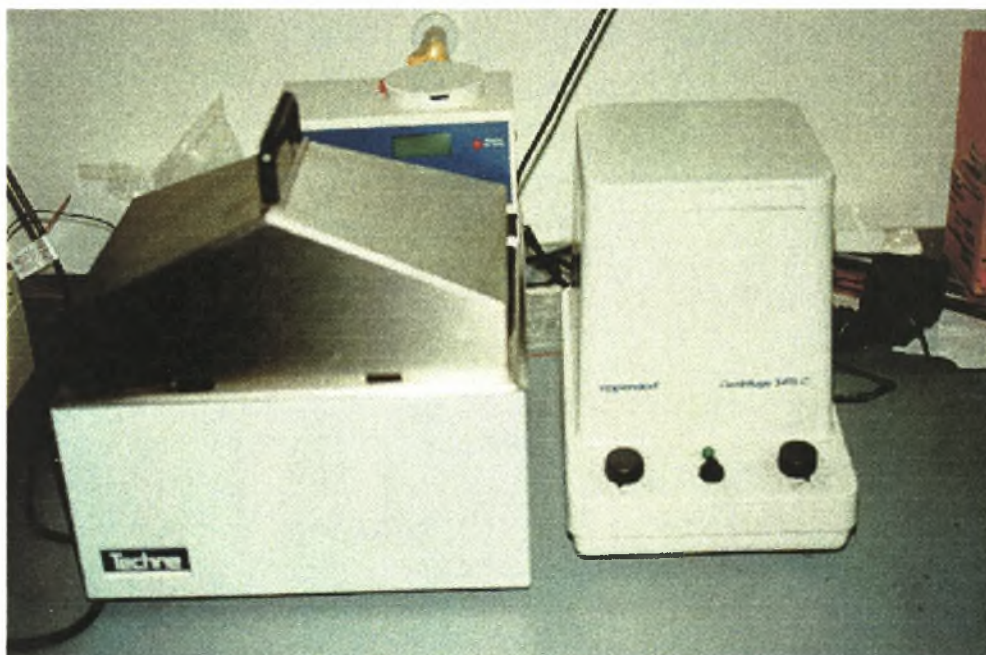
Μετά το πέρας της αντίδρασης, το πολλαπλασιασμένο DNA τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, εικόνα 5. Η συσκευή αποτελείται από μία γέφυρα (bridge), εικόνα 6, όπου βάλαμε το πήκτωμα της αгарόζης (αφού είχε προστεθεί το βρωμιούχο αιθίδιο), όταν ήταν ακόμα ζεστό και κατά συνέπεια σε υγρή μορφή. Στην άκρη της γέφυρας βάλαμε την χτένα (comb), έτσι ώστε όταν στερεοποιήθηκε το πήκτωμα και την βγάλαμε να δημιουργηθούν εσοχές. Στις εσοχές βάλαμε 8μl DNA και 2μl loading buffer βρωμοφαινόλης. Το loading buffer εκτός από βρωμοφαινόλη περιείχε και γλυκερόλη, έτσι ώστε λόγω μικρού M.B. να προχωρά πιο μπροστά από το DNA και να φαίνονται με γυμνό μάτι σε πιο σημείο βρίσκονταν οι μπάντες. Η συσκευή

ηλεκτροφόρησης είχε στις δύο άκρες από ένα ηλεκτρόδιο, ένα θετικό και ένα αρνητικό. Μόλις τέθηκε σε λειτουργία με τον τροφοδότη EC-3000-90 στα 100Volt, εικόνα 5, έπρεπε το DNA να βρίσκεται στην άκρη του αρνητικού ηλεκτροδίου ώστε να κινηθεί μέσα στο πήκτωμα προς τον θετικό πόλο.

Σε μία περίπου ώρα βγάλαμε την γέφυρα και εκθέσαμε το gel σε υπεριώδη ακτινοβολία, εικόνα 7. Οι μπάντες του DNA που πολλαπλασιάστηκαν φωσφορίζανε και με την κάμερα και τον εκτυπωτή βγάλαμε τις φωτογραφίες, εικόνα 8.



Εικόνα 2: Πιπέτες και tips των 1000, 100, 100 και 10 µl αντίστοιχα και μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες των 1.7 και 0.7 µl.



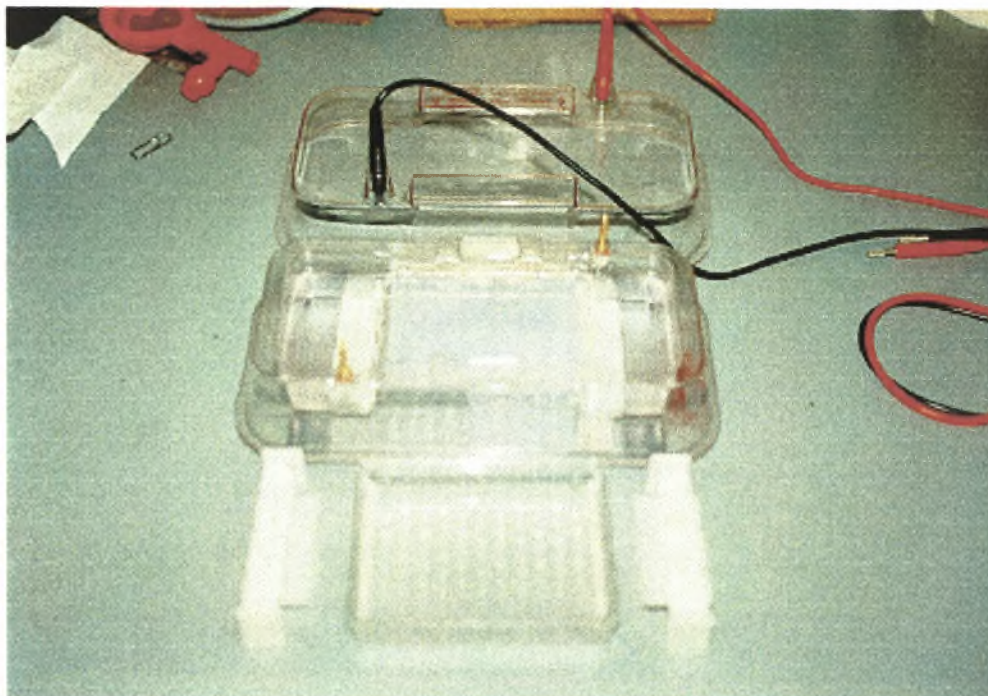
Εικόνα 3: Το υδατόλουτρο Techne και η μικροφυγόκεντρος Eppendorf.



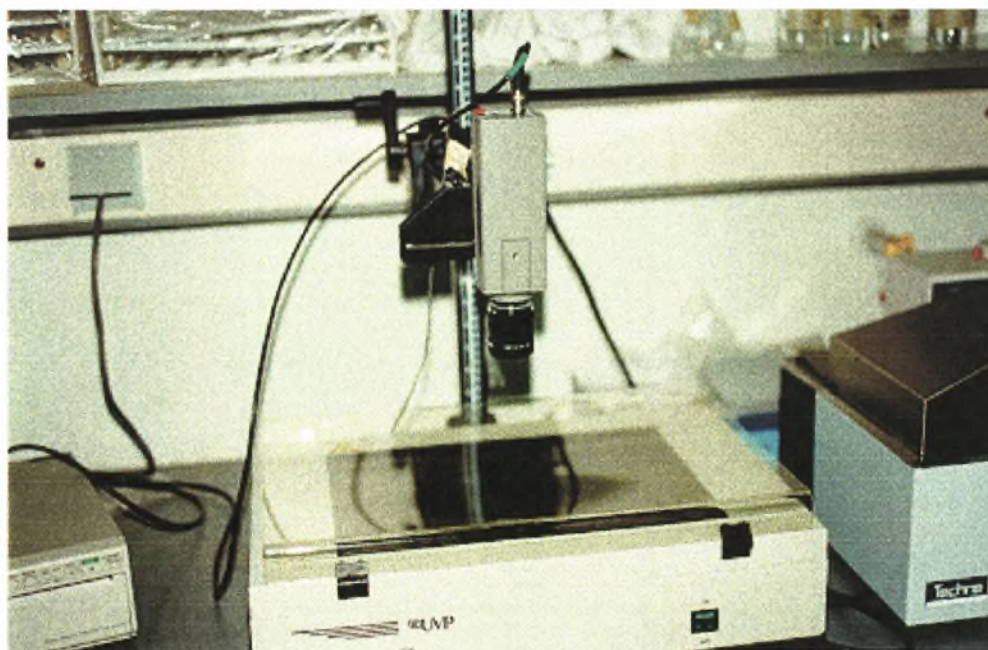
Εικόνα 4: Ο θερμοκυκλοποιητής Biometra.



Εικόνα 5: Ο τροφοδότης ρεύματος EC3000-90 και το mini-gel.



Εικόνα 6: Η συσκευή ηλεκτροφόρησης (mini-gel) και τα σύνεργα παρασκευής αγαρόζης (χτένες, γέφυρα).



Εικόνα 7: Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και ψηφιακή κάμερα SONY.



Εικόνα 8: Οθόνη προβολής των φωσφορίζοντων ζωνών DNA και εκτυπωτής εικόνας.

Δ. Αποτελέσματα - Συζήτηση

1. Συμβατική αξιολόγηση

Οι 160 γενότυποι και οι 3 απογονικοί τύποι (S₁, HS και TC), αξιολογήθηκαν στον πειραματικό αγρό από το Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών. Μετρήθηκε εκτός της έντασης του πράσινου χρώματος των φύλλων, δηλαδή την χλωροφύλλη (leaf greenness, LG) και άλλα χαρακτηριστικά όπως πολυδημία, υγρασία, απόδοση. Οι τρεις τύποι οικογενειών αξιολογήθηκαν σε διαφορετικές περιοχές, αλλά στα αποτελέσματα δεν υπάρχει η επίδραση των περιοχών γιατί οι τιμές έχουν διορθωθεί ως προς τον κοινό μάρτυρα.

Η συμπεριφορά των 160 S₀ γενοτύπων ως προς το LG για κάθε τύπο οικογένειας *per se* εμφανίζεται στα διαγράμματα 1,2 και 3. Οι τιμές αυτές είναι διορθωμένες για τις επιδράσεις του περιβάλλοντος (Λαζάρου κ.α., 1996; Goulas et al., 1997).

Πίνακας 1: Μέσες τιμές SPAD κατά τύπο οικογένειας και στοιχεία διακύμανσης.

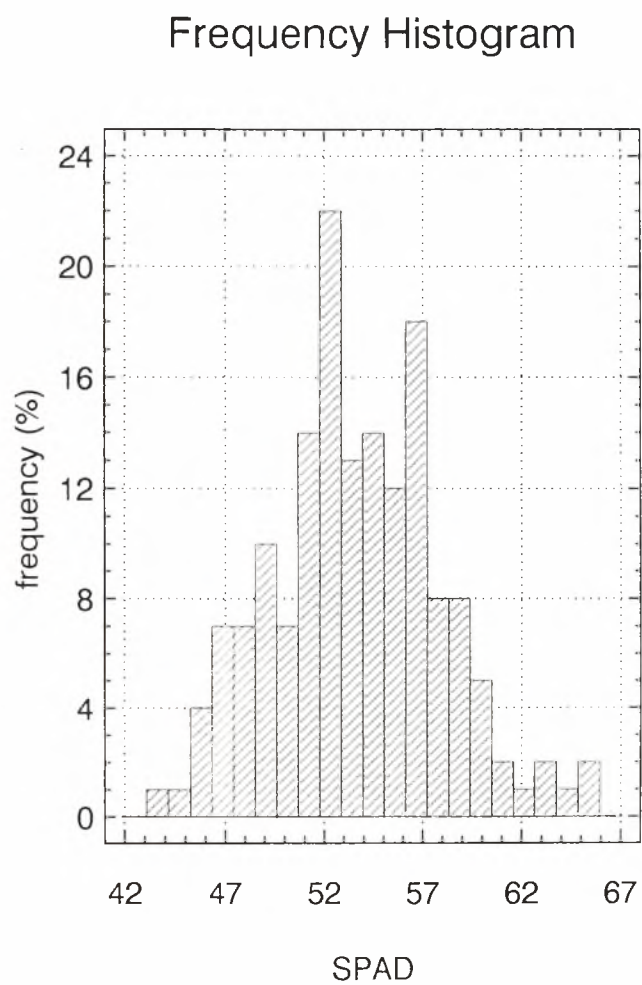
	S ₁	HS	TC
Μέσος όρος	53	55	56
Τυπική απόκλιση	4	3	2
Διακύμανση	18	12	7
C.V.	8	6	4

Το χαρακτηριστικό LG ακολουθεί πρακτικά την κανονική κατανομή και οι διαφορές στις μέσες τιμές μεταξύ οικογενειών (πίνακας 1) ήταν πρακτικά ίδιες για τις HS και TC οικογένειες και λίγο χαμηλότερες όπως αναμενόταν για την S₁. Το ίδιο ισχύει και

για τις διακυμάνσεις. Μεγαλύτερη διακύμανση για την S_1 και μικρότερη για τη TC (πίνακας 1). Γενικά οι τιμές ήταν υψηλές και έδειξαν σχετική επάρκεια αζώτου (Blackmer et al., 1994). Με βάση τα προηγούμενα στοιχεία εκτιμήθηκαν οι τιμές Ομομεικτική εξασθένηση (Διάγραμμα 4) και Ετέρωση (Διαγράμματα 5 και 6).

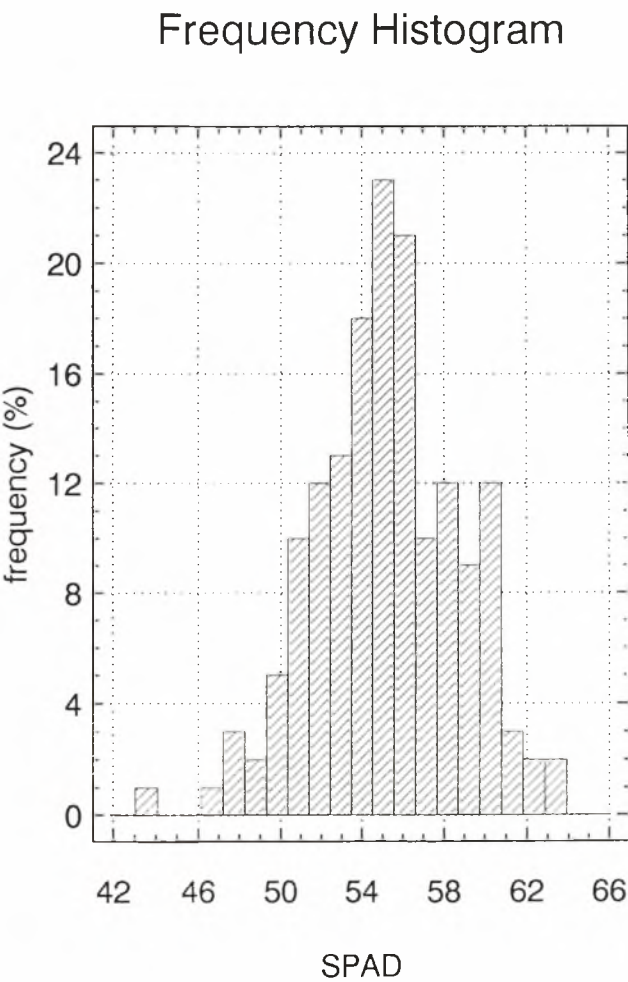
Η μέση Ομομεικτική εξασθένηση ήταν 2.7%, περίπου στο ένα τέταρτο της αντίστοιχης τιμής για την απόδοση (Goulas et al., 1997) και ήταν μία ένδειξη ότι το χαρακτηριστικό LG συμπεριφέρεται ως ποσοτικό κληρονομικό χαρακτηριστικό. Οι αντίστοιχες τιμές $HET_{(I)}$ και $HET_{(II)}$ ήταν 4.6% και 1.8% αντίστοιχα, ενώ για την απόδοση στον ίδιο πληθυσμό βρέθηκαν τιμές $HET_{(I)}$ 65.7% και $HET_{(II)}$ 44.5% (Goulas et al., 1997).

Διάγραμμα 1: Ιστόγραμμα συχνοτήτων για το LG σε μονάδες SPAD των αυτογονιμοποιούμενων ατόμων (S_1).



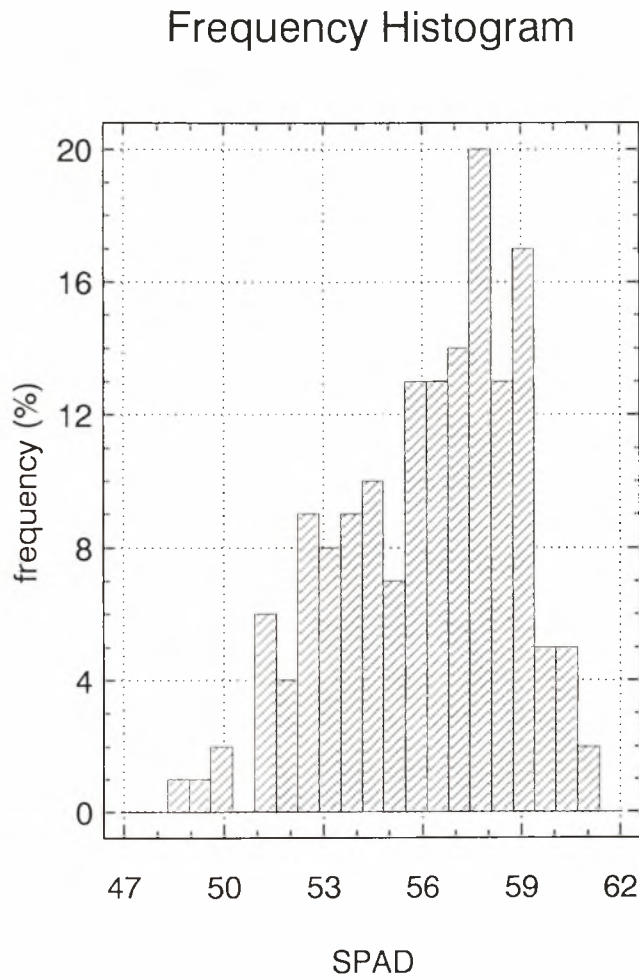
M.O.= 53.6±4 Διακύμανση= 18.6 C.V.= 8%

Διάγραμμα 2: Ιστόγραμμα συχνοτήτων για το LG σε μονάδες SPAD των ετεροθαλλών ατόμων (HS).



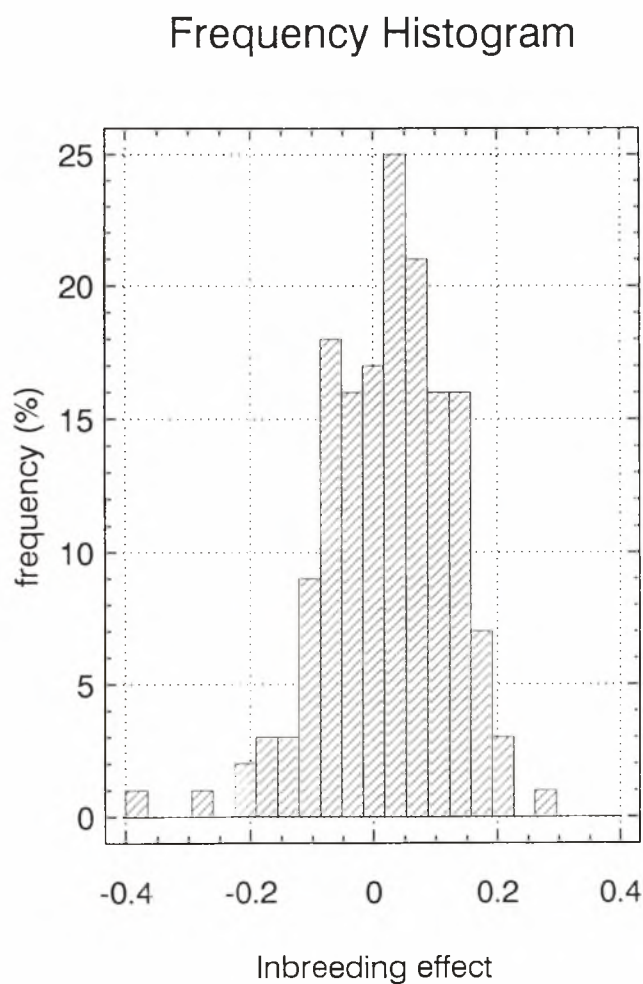
M.O.= 55.1±3 Διακύμανση= 12.5 C.V.= 6.4%

Διάγραμμα 3: Ιστόγραμμα συχνοτήτων για το LG σε μονάδες SPAD των ατόμων από την διασταύρωση δοκιμασίας (TC).

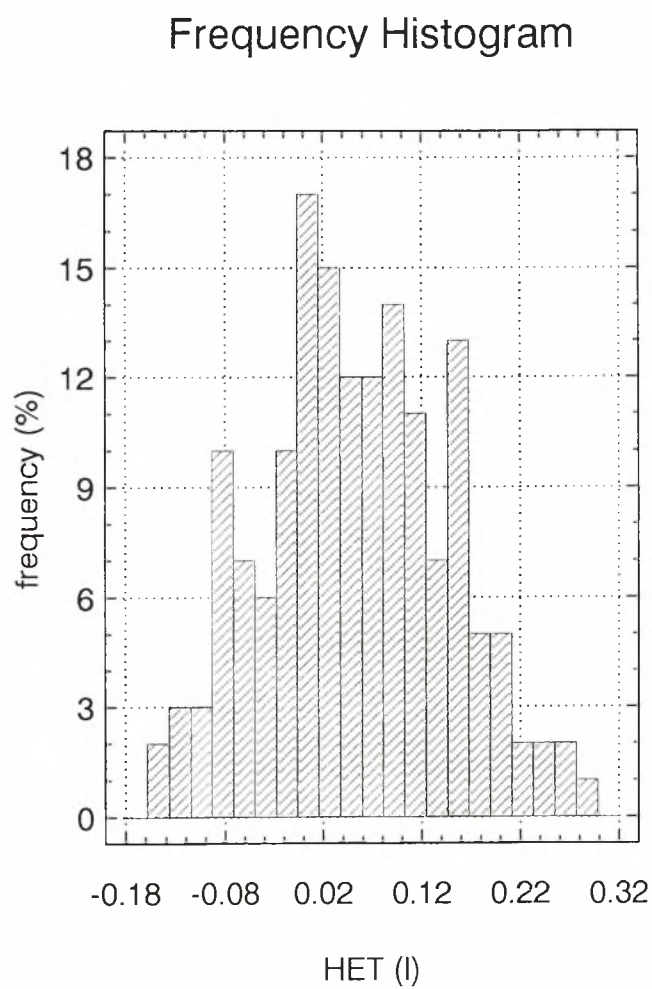


M.O.= 56.1±2 Διακύμανση= 7.2 C.V.= 4.7%

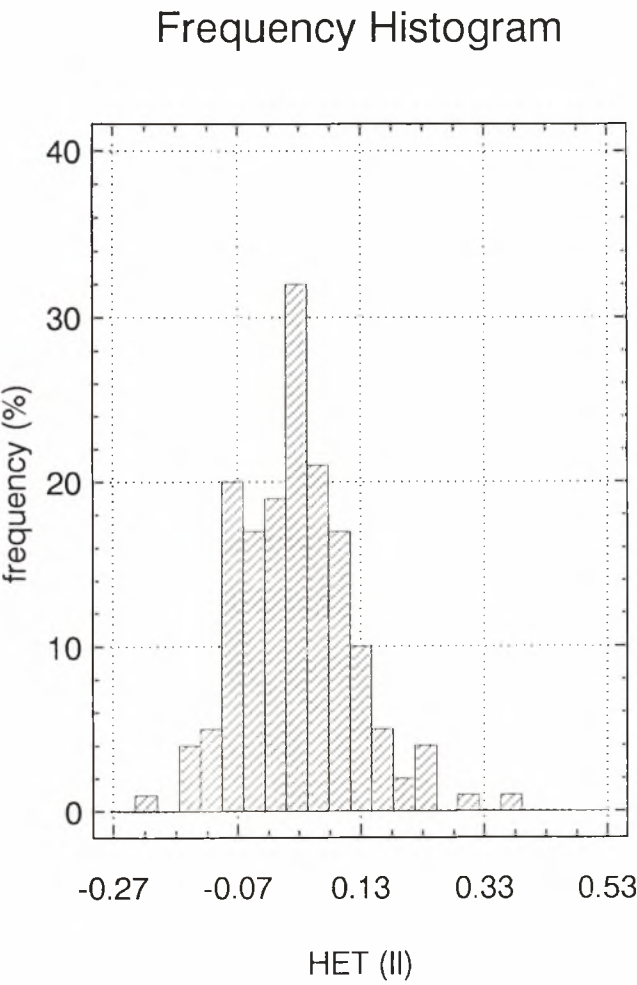
Διάγραμμα 4: Ιστόγραμμα συχνοτήτων για την Ομομεικτική εξασθένηση , όπου $\text{Inbreeding depression} = 1 - S_1/HS$.



Διάγραμμα 5: Ιστόγραμμα συχνοτήτων για την $HET_{(I)}$, όπου $HET_{(I)} = TC/S_1 - 1$.



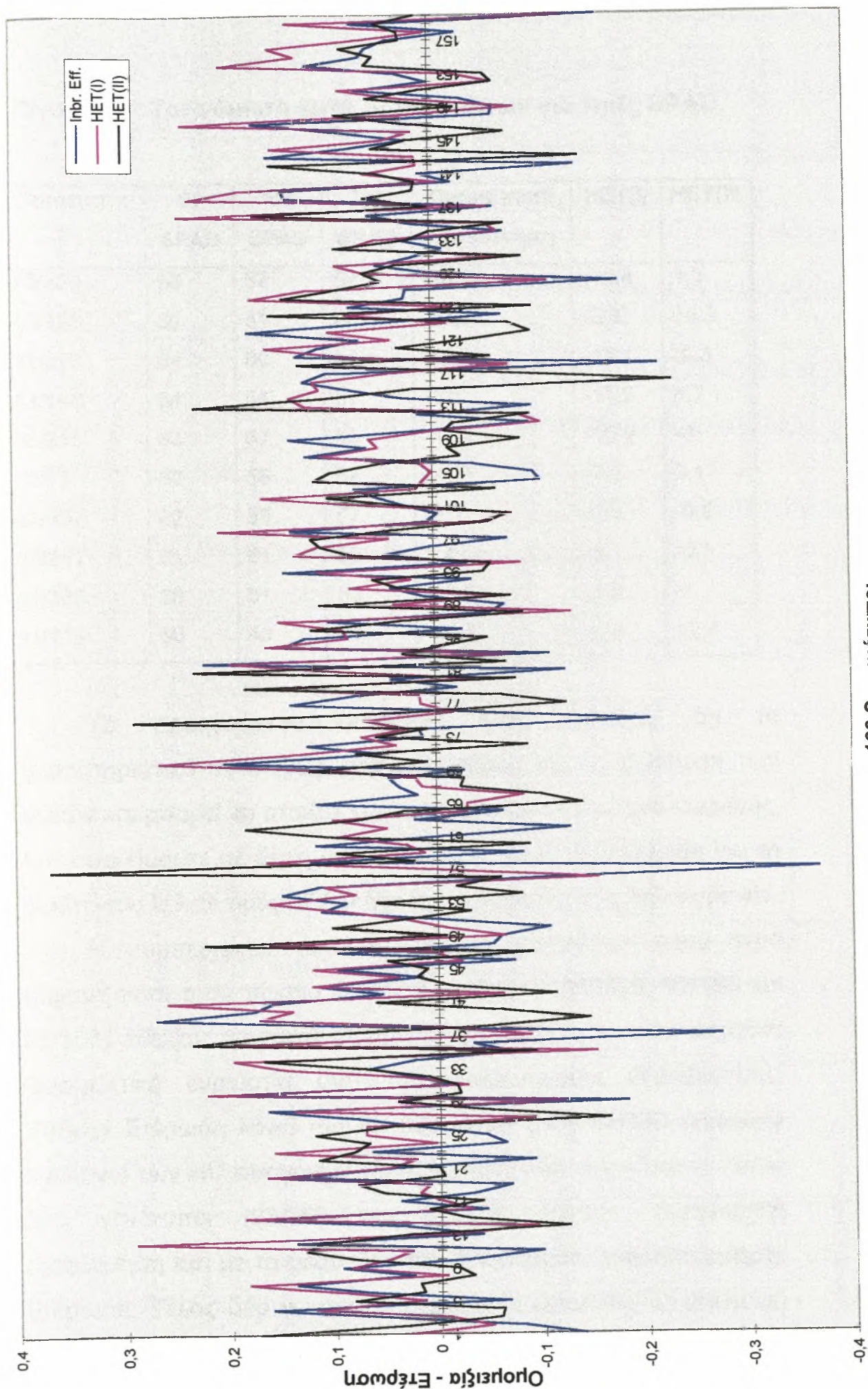
Διάγραμμα 6: Ιστόγραμμα συχνοτήτων για την $HET_{(II)}$, όπου $HET_{(II)}=TC/HS - 1$.



Η σχέση των τριών παραμέτρων μεταξύ τους εμφανίζεται στο διάγραμμα 7. Είναι προφανές ότι δεν υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων, ενώ παρατηρήθηκαν γενότυποι με αντίθετες τάσεις. Έτσι παρατηρήθηκαν 46 γενότυποι όπου είχαν ομομεικτική εξασθένηση και Ετέρωση ($HET_{(I)}$ και $HET_{(II)}$). Οι 18 από τους 160 είχαν αρνητική ομομεικτική εξασθένηση δηλαδή ευρωστία και ταυτόχρονα Ετέρωση ($HET_{(I)}$ ή $HET_{(II)}$) είτε λόγω των S_1 απογόνων, είτε λόγω των HS απογόνων. Το ίδιο βρέθηκε και για 34 γενότυπους με την διαφορά ότι είχαν ομομεικτική εξασθένηση. Επίσης 9 γενότυποι είχαν αρνητική ομομεικτική εξασθένηση δηλαδή ευρωστία αλλά χωρίς Ετέρωση. Τέλος 20 γενότυποι έδειξαν την χειρότερη συμπεριφορά με ομομεικτική εξασθένηση και χωρίς Ετέρωση.

Ταξινομώντας τις τιμές SPAD ως προς τους S_1 απογόνους βρέθηκαν 10 S_0 γενότυποι με την καλύτερη συμπεριφορά (πίνακας 2). Παρατηρήθηκαν τιμές SPAD που κυμαίνονταν από 66 έως 60. Οι συγκεκριμένοι γενότυποι (92/320, 93/153, 92/318, 93/146, 93/215, 92/11, 93/197, 92/265, 93/118) παρουσίασαν αρνητική Ομομεικτική εξασθένηση, δηλαδή ευρωστία εκτός από έναν (92/251). Αυτό σημαίνει ότι παρόλο που βρίσκονται σε ομοζυγωτική κατάσταση υπερέχουν σε σχέση με το μέσο όρο. Ετέρωση δεν υπήρχε εκτός από δύο γενότυπους (93/153 και 93/118) όπου εκτός της Ομομεικτικής ευρωστίας, έδειξαν και Ετέρωση ($HET_{(II)}$ λόγω των HS απογόνων). Οι S_1 απόγονοι είναι υποσχόμενο υλικό για επιλογή με έμμεσα φυσιολογικά κριτήρια που έχουν στενή συσχέτιση με την απόδοση και με υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας, όπως το χαρακτηριστικό LG.

Διάγραμμα 7: Ομομετρική εξασθένιση και Ετέρωση 160 S0 γενοτύπων για τιμές SPAD



160 S0 γενοτύποι

Πίνακας 2: Ταξινόμηση κατά S₁ γενοτύπων για τιμές SPAD.

Γενότυποι	S1 SPAD	HS SPAD	TC SPAD	Ομομεικτική Εξασθένηση	HET(I)	HET(II)
92/320	66	57	57	-16,2	-12,8	1,3
93/153	65	51	60	-27,1	-8,8	15,9
92/318	64	60	54	-6,9	-15,1	-9,3
93/146	64	54	57	-18	-11,2	4,7
93/215	63	57	53	-11,1	-15,5	-6
92/11	62	56	57	-11,1	-7,2	3,1
93/197	62	58	57	-6,1	-6,5	-0,8
93/251	61	61	56	1,4	-8,1	-9,4
92/265	60	51	53	-18,1	-1,2	4
93/118	60	49	56	-21,7	-7,4	12,7

Τα προηγούμενα δεδομένα είναι ενδείξεις ότι το χαρακτηριστικό αυτό (LG) έχει ενδιαφέρον για τη Βελτίωση των φυτών και μπορεί να αποβεί χρήσιμο ως έμμεσο κριτήριο επιλογής. Απ’ όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε τέτοια προσέγγιση για τη μελέτη του LG σε τιμές SPAD δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

Η συμπεριφορά των επιλεγμένων γενοτύπων στον αγρό εμφανίζονται στον πίνακα 3. Τρεις γενότυποι (93/320, 93/198 και 93/153) έδειξαν αρνητική Ομομεικτική εξασθένηση που σημαίνει Ομομεικτική ευρωστία αντί της αναμενόμενης εξασθένησης. Υπήρχε Ετέρωση λόγω των S₁ απογόνων στον 93/120 γενότυπο και λόγω των HS απογόνων στους άλλους δύο γενοτύπους. Άλλοι δύο γενότυποι (93/253 και 93/155) έδειξαν Ομομεικτική εξασθένηση ίση με το μέσο όρο του πληθυσμού, ενώ δεν υπήρχε Ετέρωση. Τέλος δύο γενότυποι έδειξαν Ομομεικτική Εξασθένηση

πολύ υψηλότερη του μέσου όρου του πληθυσμού και η Ετέρωση οφειλόταν στους S_1 απογόνους.

Πίνακας 3: Συμπεριφορά των επιλεγμένων γενοτύπων στον αγρό ως προς Ομομειξία και Ετέρωση.

Γενότυποι	S_1 (SPAD)	HS (SPAD)	TC (SPAD)	Ομομεικτική εξασθένηση	HET (I)	HET (II)
93/29	48	56	57	13,8	18,35	2
92/320	66	57	57	-16,2	12,8	1,3
93/202	52	57	57	11,1	20	-3
93/253	56	57	51	1,9	-8	-10
93/155	53	55	52	3,6	-0,3	-3,9
93/198	58	53	58	-10,8	-0,6	10,1
93/153	65	51	60	-27,1	-8,8	15,9

Οι επιλεγμένοι S_0 γενότυποι αξιολογήθηκαν για το χαρακτηριστικό LG στο βιοκλιματικό θάλαμο. Οι μετρήσεις ήταν δύο και πάρθηκαν η μία στο στάδιο των τεσσάρων μόνιμων φύλλων και η άλλη λίγο πριν. Στο πείραμα του αγρού τα φυτά κατά την λήψη παρατηρήσεων ήταν μεγαλύτερης ηλικίας, γι’ αυτό για την λήψη συμπερασμάτων θα χρησιμοποιήσουμε τα φυτά μετά την έκπτυξη του τετάρτου μόνιμου φύλλου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 4. Η B-73 είχε κατά μέσο όρο μεγαλύτερη τιμή SPAD από τα S_1 και HS άτομα. Τα TC άτομα είχαν κατά μέσο όρο μεγαλύτερη τιμή SPAD που οφείλεται στην Ετέρωση και τα S_1 άτομα την μικρότερη τιμή που οφείλεται στην Ομομεικτική εξασθένηση. Οι τιμές SPAD ακόμη και σε αυτό το πρώιμο στάδιο, ήταν μια ένδειξη ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες αξιολογήσεως το γενετικό υλικό είτε είχε την ικανότητα να αποδίδει ικανοποιητικά σε



συνθήκες μειωμένου αζώτου, είτε μπόρεσε να αξιοποιήσει αποτελεσματικά το διαθέσιμο άζωτο.

Πίνακας 4: Εκτίμηση χλωροφύλλης ως μέσο όρο των επτά γενοτύπων στο στάδιο των τεσσάρων μόνιμων φύλλων και σύγκριση με το αντίστοιχο της καθαρής σειράς.

Οικογένειες	Χλωροφύλλη (Μονάδες SPAD)	Χλωροφύλλη (Μονάδες SPAD)
	Γενότυποι	B - 73
S ₁	38,9 (35,8 - 42)	41,6 (38,5 - 44,7)
HS	39,6 (35,1 - 44,1)	41,6 (37,1 - 46,1)
TC	43,5 (40,5 - 46,5)	41,6 (38,6 - 44,6)

Σημ.: Στην παρένθεση δίνεται το εύρος.

Η συμπεριφορά των επιλεγμένων γενοτύπων στο θάλαμο εμφανίζονται στον πίνακα 5. Έξι γενότυποι (93/29, 92/320, 93/202, 93/155, 93/198 και 93/153) έδειξαν μέση Ομομεικτική εξασθένηση ίση με την μέση τιμή του πληθυσμού, ενώ η Ετέρωση οφειλόταν στους S₁ και HS απογόνους. Τέλος ένας γενότυπος (93/253) έδειξε Ομομεικτική εξασθένηση, ενώ ταυτόχρονα Ετέρωση εξαιτίας των S₁ και HS απογόνων.

Πίνακας 5: Συμπεριφορά των γενοτύπων ως προς το LG στο θάλαμο.

Γενότυποι	Ομομεικτική εξασθένηση	HET (I)	HET (II)
93/29	0	14,4	14,4
92/320	-4	13,5	18,1
93/202	-1	16,4	18,1
93/253	12	28,3	12,8
93/155	5	20,5	14,5
93/198	-1,6	10	12,4
93/153	3,1	25,7	21,8

Στους πίνακες 6, 7 και 8 φαίνεται η συμπεριφορά των γενοτύπων για SPAD και ύψους σε σύγκριση με την B-73. Οι τιμές του συντελεστή παραλλακτικότητας (C.V.) ήταν πολύ ικανοποιητικές (4,2 - 9,5) και για τις δύο μετρήσεις χλωροφύλλης. Συνεκτιμώμενα όλα τα στοιχεία πειραματικής ακρίβειας ήταν προφανές ότι υπήρχε ακριβή εκτίμηση και η επιλογή ήταν εφικτή.

Συγκεκριμένα όπως φαίνεται στον πίνακα 6 για τα αυτογονιμοποιούμενα άτομα (S_1), η καθαρή σειρά ήταν καλύτερη και στις δύο μετρήσεις χλωροφύλλης. Στατιστικά διαφέρει από τους 93/29, 93/253 και 93/155 στην πρώτη μέτρηση και από τους 93/29, 93/202, 93/253, 93/155 και 93/153 κατά την δεύτερη μέτρηση. Ο γενότυπος 93/198 είχε λίγο μεγαλύτερη τιμή από την καθαρή σειρά στην πρώτη μέτρηση χωρίς όμως να διαφέρουν στατιστικά. Η καθαρή σειρά έχει το μικρότερο ύψος στο σημείο έκπτυξης του τετάρτου μόνιμου φύλλου και αυτό δικαιολογείται λόγω 100% ομομειξίας.

Στον πίνακα 7 που αναφέρεται στα ετεροθαλή άτομα (HS), η καθαρή σειρά B-73 στην πρώτη μέτρηση διαφέρει μόνο με τον γενότυπο 93/155, αν και έχει μεγαλύτερο μέσο όρο. Στην δεύτερη μέτρηση διαφέρει και από τους 7 γενοτύπους. Με την μέτρηση του ύψους φαίνεται πάλι ότι η καθαρή σειρά είναι η πιο χαμηλή.

Τέλος στον πίνακα 8 που αναφέρεται στα άτομα από διασταύρωση με την καθαρή σειρά B-73 (TC), φαίνεται ότι οι οικογένειες έχουν μεγαλύτερο μέσο όρο από την καθαρή σειρά, εκτός τον 93/155 για την πρώτη μέτρηση χλωροφύλλης. Στην δεύτερη μέτρηση οι μέσοι όροι είναι μικρότεροι, αλλά δεν διαφέρει κανένας στατιστικά από την καθαρή σειρά. Ο γενότυπος 93/198 είχε μεγαλύτερη τιμή και στις δύο μετρήσεις. Τα παραπάνω εξηγούνται γιατί έχει αυξηθεί η ετέρωση στα TC άτομα. Το ύψος της καθαρής σειράς παραμένει το μικρότερο σε σύγκριση με τα TC άτομα.

Πίνακας 6: Συμπεριφορά S₁ γενοτύπων για SPAD και ύψος σε σύγκριση με την B-73.

Γενότυποι	M.O. χλωροφύλλης 1 ¹	M.O. χλωροφύλλης 2 ²	M.O. ύψους
93/29	36.9	39.7	23
92/320	41.1	43.6	23
93/202	39.9	39.7	24
93/253	37.6	35.7	24
93/155	35.3	38.0	23
93/198	42.1	44.4	24
93/153	39.7	37.3	21
B-73	41.6	48.5	20
C.V.	5.9	8.1	10.1
E.Σ.Δ. _{.05}	3.1	4.4	3
F	**	**	*

¹: 1η μέτρηση χλωροφύλλης
²: 2η μέτρηση χλωροφύλλης
* : Για πιθανότητα 95%
** : Για πιθανότητα 99%

Πίνακας 7: Συμπεριφορά HS γενοτύπων για SPAD και ύψος σε σύγκριση με την B-73.

Γενοτύποι	M.O. χλωροφύλλης 1 ¹	M.O. χλωροφύλλης 2 ²	M.O. ύψους
93/29	39.9	39.7	20
92/320	40.2	41.9	24
93/202	39.6	39.1	26
93/253	39.2	40.6	28
93/155	36.4	40.0	25
93/198	42.7	43.4	27
93/153	39.5	38.5	24
B-73	41.6	48.5	20
C.V.	5.8	5.1	7.3
E.Σ.Δ. _{.05}	4.5	2.8	2
F	*	**	**

¹: 1η μέτρηση χλωροφύλλης
²: 2η μέτρηση χλωροφύλλης
* : Για πιθανότητα 95%
** : Για πιθανότητα 99

Πίνακας 8: Συμπεριφορά TC γενοτύπων για SPAD και ύψος σε σύγκριση με την B-73.

Γενοτύποι	M.O. χλωροφύλλης 1 ¹	M.O. χλωροφύλλης 2 ²	M.O. ύψους
93/29	42.3	45.4	22
92/320	44.9	48.3	29
93/202	43.3	46.2	27
93/253	42.1	45.8	23
93/155	41.1	45.8	25
93/198	46.0	48.8	26

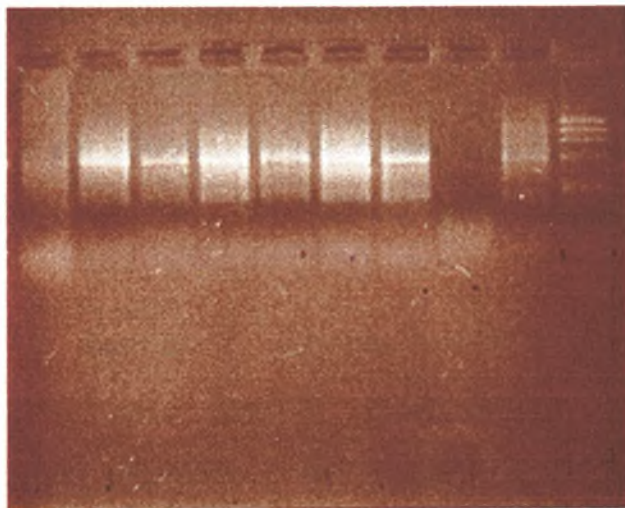
93/153	44.7	46.9	24
B-73	41.6	48.5	20
C.V.	5.1	5.3	5.9
E.Σ.Δ. ₀₅	3	3.4	2
F	*	*	**

¹: 1η μέτρηση χλωροφύλλης
²: 2η μέτρηση χλωροφύλλης
* : Για πιθανότητα 95%
** : Για πιθανότητα 99%

Οι συνθήκες αγρού δεν μπορούν να δημιουργηθούν σε ένα θάλαμο, έχοντας τέλειες συνθήκες. Σύμφωνα με τα προηγούμενα, αλλά και τα αποτελέσματα του αγρού, ο πληθυσμός είχε τις προϋποθέσεις του υποσχόμενου γενετικού υλικού, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε σχήμα βελτιώσεως πληθυσμών και δημιουργία καθαρών σειρών (Γούλας et al, 1994).

2. Μοριακή αξιολόγηση

Τα αποτελέσματα από την μοριακή αξιολόγηση, φαίνονται στην εικόνα 9. Μετά από πολλές και ανεπιτυχής προσπάθειες, τελικά τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι οι 7 τουλάχιστον οικογένειες αλλά και οι τρεις τύποι τους S_1 , HS και TC, δεν διέφεραν για το γονίδιο της Καταλάσης. Επιπλέον οι 7 οικογένειες (αν και δεν φαίνεται καθαρά στην εικόνα 9), είχαν η κάθε μία συνολικά 7 ζώνες. Και οι 7 ζώνες ταυτίζονταν σε όλες τις οικογένειες. Αυτό το δικαιολογήσαμε διότι τα Primer που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση δεν ήταν συγκεκριμένα για την Καταλάση του καλαμποκιού, αλλά ήταν πληθυσμός Primer, γενικά για την Καταλάση. Έτσι τα Primer “διαβάζουν” και άλλες περιοχές του γονιδίου, έτσι ώστε να πολλαπλασιαστούν και αυτές κατά την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).



Εικόνα 9: Φωτογραφία των φωσφοριζόντων ζωνών από τον εκτυπωτή εικόνας (εικόνα 8).

E. Βιβλιογραφία

- Blackmer, T.M., Schepers, J.S., Use of a chlorophyll meter to monitor Nitrogen status and schedule fertigation for corn, J. Prod. Agric. Vol. 8, 1995, no. 1, p. 56-60.
- Blackmer, T.M., Schepers, J.S., and Varnel G.E., Light reflectance compared with other Nitrogen stress measurements in corn leaves, Agron. Journal, Vol. 86, 1994, No 6, p. 934-938.
- Blackmer, T.M., Schepers, J.S., and Varnel G.E., Remote sensing techniques to identify Nitrogen deficiency in corn, In Press.
- Blackmer, T.M., Schepers, J.S., Varnel, G.E., Walter-Shea, E.A., Nitrogen deficiency detection using reflected shortwave radiation from irrigated corn canopies, Agroclimatology, Agronomy Journal, volume 88, January - February, 1996, Number 1.
- Blackmer, T.M., Schepers, J.S., Vigil M.F., Chlorophyll meter readings in corn as affected by plant spacing, Commun. Soil Sci. Plant Anal., 24(17 & 18), 2507-2516(1996), by Marcel Deccer Inc.
- Bramel-Cox, P.J., Barker, T., Zavala-Garcia, F. and J.D. Eastin, 1989, Selection and testing environments for improved performance under reduced - input conditions, p. 48-53, In Plant Breeding and sustainable agriculture: Considerations for objectives and methods, Wisconsin: CSSA special publication number 18, 1991, p. 93.
- Γαλανοπούλου - Σενδουκά, Σ., 1995, Ειδική Γεωργία Ι, Βόλος.
- Γούλας, Χ.Κ., Βελτίωση φυτών, Πανεπιστημιακές παραδόσεις, Βόλος, σελ. 114, 1994.

- Γούλας Χ.Κ., Δεληπορανίδου Δ., Γκέρτσης Α., Κατσαντώνης Ν., Σφακιανάκης Ι., Καραμαλίγκας Χ., Μπλέτσος Ε. και Κατράνης Ν., Συνδυασμένη επιλογή HS, S₁ και TC οικογενειών σε πληθυσμό καλαμποκιού για μειωμένες απαιτήσεις αζώτου, Ετήσια έκθεση προόδου, 1994.
- Goulas, C., Deliporanidou, D., Sfakianakis, J., Katsantonis, N., 1995, Selecting promising germplasm to develop maize (*Zea mays* L) inbred lines combining high yield cross performance with *per se* yielding ability under low nitrogen inputs.
- Goulas, C., Deliporanidou, D., Katsantonis, N., Sfakianakis, J., Karamaligas, H., Katranis, N., Mpletsos, E., Gertsis, C., 1997, Combined selection based on HS, S₁ and TC family evaluation under low Nitrogen conditions in Maize, In Tsaftaris A.j., Ed. Genetics, Biotechnology and Biology of Maize and Sorghum, p. 163-168, The Royal Society of Chemistry, Cambridge U.K.
- Δεληπορανίδου Δ., Γούλας Χ., Κατσαντώνης Ν., Σφακιανάκης Ι., Καραμαλίγκας Χ., Κατράνης Ν., Μπλέτσος Ε., Γκέρτσης Α., Παραγωγική συμπεριφορά γενετικού υλικού καλαμποκιού σε συνθήκες υπολλειματικού αζώτου.
- Earl, H.J., Tollenaar, M., Maize leaf absorptance of photosynthetically active radiation and its estimation using a chlorophyll meter, Crop science, 1997, vol 37, No 2, p. 436-440.
- Falconer, D.S., 1960: Introduction to quantitative genetics, New York: The Ronald press Co, p.320.
- Hageman, R.H., Lambert, R.J., The use of Physiological Traits for Corn Improvement, In Corn and Corn Improvement, Agronomy, No 18, 1988.

- Hallauer, A.R., Russel, W.A., Lamkey, K.R., Corn Breeding, In Corn and Corn Improvement, Agronomy, No 18, 1988.
- Καλτσίκης, Π.Ι., 1989, Βελτίωση φυτών, σελ. 535, Πειραιάς.
- Καλτσίκης, Π.Ι., 1992, Η βελτίωση του καλαμποκιού, σελ. 153-234, Ειδική Βελτίωση Φυτών, Πειραιάς.
- Λαζάρου Ε., Γούλας Χ., Δεληπορανίδου Δ., Ευγενίδης Γ., Μπλέτσος Ε., Καραμαλίκας Χ., Δυνατότητα έμμεσης επιλογής για απόδοση στο καλαμπόκι με αξιολόγηση της πολυδημίας, του δείκτη ASI και της περιεκτικότητας των φύλλων σε χλωροφύλλη, Ελληνική Εταιρία Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, Φλώρινα, 1996, σελ. 42-48.
- Lonnquist, J.H., 1967, Mass selection for prolificacy in maize, Zuchter/Genet. Breed. Res., Vol. 37, Nr.4, p.185-188.
- Ma, B.L., Morrison, M.J., Dwyer, L.M., Canopy light reflectance and field greenness to assecc nitrogen fertilization and yield of maize, Agronomy journal, 1996, vol 88, p. 915-920.
- Marquard, R.D. Tipton, J.L., Relationship between extractable chlorophyll and *in situ* method to estimate leaf greenness, Hort Science, 1987, 22(6): p. 1327.
- Neuffer, M.G., Coe, E.H., and Wessler, S.R., Mutants Of Maize, In Molecular Biology and Molecular Genetics, pp 464, 1996.
- Peterson, T.A., Blackmer, T.M., Francis, D.D., and Schepers, J.S., Using a Chlorophyll meter to improve Nitrogen management, University of Nebraska - Lincoln, 1993.
- Scandalios, J.G., Regulation and Properties of plant Catalases, Chapter 11, p. 276-309, 1991.

- Schepers, J.S., Blackmer, T.M., and Francis, D.D., Predicting Nitrogen needs for corn in humid regions: Using Chlorophyll meters.
- Schepers, J.S., Francis, D.D., Vigil, M., and Below, F.E., Comparison of corn leaf Nitrogen concentration and chlorophyll meter readings, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 1992, 23(17-20), p. 2173-2187.
- Sfakianakis, J.N., Single-cross hybrid development in maize by reciprocal half-sib selection, *Crop. Science*, Vol.35.
- Σφήκας, Α.Γ., 1991, Αραβόσιτος, σελ. 85-123, Ειδική Γεωργία, Τόμος Ι, Θεσσαλονίκη.
- Τζώρτζιος, Σ.Ι., 1994, Ανάλυση και Ερμηνεία των σχεδιασμένων πειραμάτων, σελ. 161-187, Διδακτικές σημειώσεις Βιομετρίας, Βόλος.
- Tollenaar, M., McCullough, D.E., Dwyer, L., Physiological basis of the genetic Improvement of corn, In *Genetic Improvement of Field crops*, Editor Slafer, G.A., p. 183-236.

ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παράρτημα:

- **Πίνακας 9:** Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S_1 , HS, TC της S_0 οικογένειας **93/29**.
- **Πίνακας 10:** Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S_1 , HS, TC της S_0 οικογένειας **92/320**.
- **Πίνακας 11:** Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S_1 , HS, TC της S_0 οικογένειας **93/202**.
- **Πίνακας 12:** Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S_1 , HS, TC της S_0 οικογένειας **93/253**.
- **Πίνακας 13:** Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S_1 , HS, TC της S_0 οικογένειας **93/155**.
- **Πίνακας 14:** Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S_1 , HS, TC της S_0 οικογένειας **93/198**.
- **Πίνακας 15:** Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S_1 , HS, TC της S_0 οικογένειας **93/153**.
- **Πίνακας 16:** Ανάλυση παραλλακτικότητας 7 S_0 οικογενειών και της καθαρής σειράς B-73, βάση των απογόνων S_1 .
- **Πίνακας 17:** Ανάλυση παραλλακτικότητας 7 S_0 οικογενειών και της καθαρής σειράς B-73, βάση των απογόνων HS.
- **Πίνακας 18:** Ανάλυση παραλλακτικότητας 7 S_0 οικογενειών και της καθαρής σειράς B-73, βάση των απογόνων TC.
- **Πίνακας 19:** Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S_0 93/29.
- **Πίνακας 20:** Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S_0 92/320.

- **Πίνακας 21:** Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S_0 93/202.
- **Πίνακας 22:** Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S_0 93/253.
- **Πίνακας 23:** Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S_0 93/155.
- **Πίνακας 24:** Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S_0 93/198.
- **Πίνακας 25:** Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S_0 93/153.

Πίνακας 9: Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S₁, HS, TC της S₀ οικογένειας **93/29**.

A. 1^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	85.90	28.632	9.955**
Σφάλμα	16	46.02	2.876	
Σύνολο	19	131.92		

C.V. = 4.2%
E.Σ.Δ._{.05}= 2.3

B. 2^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	287.56	95.855	20.67**
Σφάλμα	16	74.2	4.6375	
Σύνολο	19	361.76		

C.V. = 4.9%
E.Σ.Δ._{.05}= 3.9

Γ. Μέτρηση ύψους 4^{ου} μόνιμου φύλλου

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	42.55	14.183	5.15**
Σφάλμα	16	44	2.75	
Σύνολο	19	86.55		

C.V. = 7.8%
E.Σ.Δ._{.05}= 2

Πίνακας 10: Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S_1 , HS, TC της S_0 οικογένειας 92/320.

A. 1^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	55.6	18.532	2.11*
Σφάλμα	12	105.21	8.767	
Σύνολο	15	160.81		

C.V. = 7%

E.Σ.Δ._{.05} = 4.6

B. 2^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	203.57	67.857	11.98**
Σφάλμα	12	67.99	5.66	
Σύνολο	15	271.56		

C.V. = 5.2%

E.Σ.Δ._{.05} = 3.7

Γ. Μέτρηση ύψους 4^{ου} μόνιμου φύλλου

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	363.41	121.14	15.2**
Σφάλμα	12	95.5	7.959	
Σύνολο	15	458.91		

C.V. = 11.5%

E.Σ.Δ._{.05} = 4

Πίνακας 11: Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S₁, HS, TC της S₀ οικογένειας 93/202.

A. 1^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	44.44	14.814	4.97**
Σφάλμα	16	47.64	2.9775	
Σύνολο	19	92.08		

C.V. = 4.2%
E.Σ.Δ._{.05}= 2.3

B. 2^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	328.38	109.46	22.43**
Σφάλμα	16	78.1	4.88	
Σύνολο	19	406.48		

C.V. = 5%
E.Σ.Δ._{.05}= 3

Γ. Μέτρηση ύψους 4^{ου} μόνιμου φύλλου

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	158.8	52.93	55.7**
Σφάλμα	16	44.4	2.775	
Σύνολο	19	203.2		

C.V. = 6.9%
E.Σ.Δ._{.05}= 2

Πίνακας 12: Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S₁, HS, TC της S₀ οικογένειας 93/253.

A. 1^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	66.62	22.2	4.07**
Σφάλμα	16	87.14	5.44	
Σύνολο	19	153.76		

C.V. = 5.8%
E.Σ.Δ._{.05}= 3.1

B. 2^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	484.87	161.62	9.78**
Σφάλμα	16	264.44	16.52	
Σύνολο	19	749.31		

C.V. = 9.5%
E.Σ.Δ._{.05}= 5.4

Γ. Μέτρηση ύψους 4^{ου} μόνιμου φύλλου

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	162.5	54.183	12.4**
Σφάλμα	16	70	4.375	
Σύνολο	19	232.55		

C.V. = 8.8%
E.Σ.Δ._{.05}= 3

Πίνακας 13: Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S₁, HS, TC της S₀ οικογένειας **93/155**.

A. 1^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	155.1	51.699	11.57**
Σφάλμα	16	71.5	4.468	
Σύνολο	19	226.6		

C.V. = 5.5%
E.Σ.Δ._{.05}= 2.8

B. 2^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	358.1	119.38	21.89**
Σφάλμα	16	87.26	5.4537	
Σύνολο	19	445.43		

C.V. = 5.4%
E.Σ.Δ._{.05}= 3.2

Γ. Μέτρηση ύψους 4^{ου} μόνιμου φύλλου

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	86.95	28.983	16.5**
Σφάλμα	16	28	1.75	
Σύνολο	19	114.95		

C.V. = 5.8%
E.Σ.Δ._{.05}= 2

Πίνακας 14: Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S_1 , HS, TC της S_0 οικογένειας **93/198**.

A. 1^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	60.69	20.231	3.37**
Σφάλμα	16	96.09	6	
Σύνολο	19	156.79		

C.V. = 5.7%

E.Σ.Δ.₀₅ = 3.3

B. 2^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	116.32	38.772	9.47**
Σφάλμα	16	65.54	4.09	
Σύνολο	19	181.85		

C.V. = 4.4%

E.Σ.Δ.₀₅ = 2.7

Γ. Μέτρηση ύψους 4^{ου} μόνιμου φύλλου

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	158	52.667	15.8**
Σφάλμα	16	53.2	3.325	
Σύνολο	19	211.2		

C.V. = 7.5%

E.Σ.Δ.₀₅ = 2

Πίνακας 15: Ανάλυση παραλλακτικότητας των απογόνων S₁, HS, TC της S₀ οικογένειας **93/153**.

A. 1^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	88.44	29.48	6.58**
Σφάλμα	16	71.66	4.478	
Σύνολο	19	160.11		

C.V. = 5.1%
E.Σ.Δ._{.05}= 2.8

B. 2^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	485.72	161.9	23.8**
Σφάλμα	16	108.74	6.79	
Σύνολο	19	594.45		

C.V. = 6%
E.Σ.Δ._{.05}= 3.5

Γ. Μέτρηση ύψους 4^{ου} μόνιμου φύλλου

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Οικογένειες	3	73.75	24.583	10.7**
Σφάλμα	16	36.8	2.3	
Σύνολο	19	110.55		

C.V. = 6.8%
E.Σ.Δ._{.05}= 2

Πίνακας 16: Ανάλυση παραλλακτικότητας 7 S₀ οικογενειών και της καθαρής σειράς B-73, βάση των απογόνων S₁.

A. 1^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Διασταυρώσεις	7	206.09	29.442	5.42
Σφάλμα	32	173.62	5.425	
Σύνολο	39	379.71		

C.V. = 5.9%

E.Σ.Δ._{.05} = 3.1

B. 2^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Διασταυρώσεις	7	643.06	91.866	8.38
Σφάλμα	32	350.89	10.96	
Σύνολο	39	993.96		

C.V. = 8.1%

E.Σ.Δ._{.05} = 4.4

Γ. Μέτρηση ύψους 4^{ου} μόνιμου φύλλου

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Διασταυρώσεις	7	99.57	14.225	2.7
Σφάλμα	32	168.4	5.2625	
Σύνολο	39	267.97		

C.V. = 10.1%

E.Σ.Δ._{.05} = 3

Πίνακας 17: Ανάλυση παραλλακτικότητας 7 S₀ οικογενειών και της καθαρής σειράς B-73, βάση των απογόνων HS.

A. 1^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Διασταυρώσεις	7	118.18	16.883	3.14
Σφάλμα	32	171.92	5.3725	
Σύνολο	39	290.1		

C.V. = 5.8%
E.Σ.Δ._{.05}= 4.5

B. 2^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Διασταυρώσεις	7	367.02	52.432	11.8
Σφάλμα	32	142.27	4.44	
Σύνολο	39	509.29		

C.V. = 5.1%
E.Σ.Δ._{.05}= 2.8

Γ. Μέτρηση ύψους 4^{ου} μόνιμου φύλλου

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Διασταυρώσεις	7	325.5	46.5	13.3
Σφάλμα	32	111.6	3.1875	
Σύνολο	39	437.1		

C.V. = 7.3%
E.Σ.Δ._{.05}= 2

Πίνακας 18: Ανάλυση παραλλακτικότητας 7 S₀ οικογενειών και της καθαρής σειράς B-73, βάση των απογόνων TC.

A. 1^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Διασταυρώσεις	7	110.74	15.821	3.2
Σφάλμα	28	138.24	4.934	
Σύνολο	35	248.98		

C.V. = 5.1%

E.Σ.Δ.₀₅ = 3

B. 2^η μέτρηση χλωροφύλλης

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Διασταυρώσεις	7	67.25	9.708	1.55
Σφάλμα	28	175.52	6.26	
Σύνολο	35	243.48		

C.V. = 5.3%

E.Σ.Δ.₀₅ = 3.4

Γ. Μέτρηση ύψους 4^{ου} μόνιμου φύλλου

Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	A.T.	M.T.	F
Διασταυρώσεις	7	247.13	39.162	18.64
Σφάλμα	28	59.03	2.1	
Σύνολο	35	333.16		

C.V. = 5.9%

E.Σ.Δ.₀₅ = 2

Πίνακας 19: Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S₀ 93/29.

	M.O. χλωροφύλλης 1 ¹	M.O. χλωροφύλλης 2 ²	M.O. ύψους
S ₁	36.9	39.7	23
HS	39.9	39.7	20
TC	42.3	45.4	22
B-73	41.6	48.5	20
C.V.	4.2	4.9	7.8
E.Σ.Δ. _{.05}	2.3	3.9	2
F	**	**	**

¹: 1η μέτρηση χλωροφύλλης
²: 2η μέτρηση χλωροφύλλης
* : Για πιθανότητα 95%
** : Για πιθανότητα 99%

Πίνακας 20: Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S₀ 92/320.

	M.O. χλωροφύλλης 1¹	M.O. χλωροφύλλης 2²	M.O. ύψους
S₁	41.1	43.6	23
HS	40.2	41.9	24
TC	44.6	49.5	31
B-73	41.6	48.5	20
C.V.	7	5.2	11.5
E.Σ.Δ.₀₅	4.6	3.7	4
F	*	**	**

1: 1η μέτρηση χλωροφύλλης
2: 2η μέτρηση χλωροφύλλης
* : Για πιθανότητα 95%
** : Για πιθανότητα 99%

Πίνακας 21: Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S₀ 93/202.

	M.O. χλωροφύλλης 1 ¹	M.O. χλωροφύλλης 2 ²	M.O. ύψους
S ₁	39.9	39.7	24
HS	39.6	39.1	26
TC	43.3	46.2	27
B-73	41.6	48.5	20
C.V.	4.2	5	6.9
E.Σ.Δ. ₀₅	2.3	3	2
F	**	**	**

¹: 1η μέτρηση χλωροφύλλης
²: 2η μέτρηση χλωροφύλλης
* : Για πιθανότητα 95%
** : Για πιθανότητα 99%

Πίνακας 22: Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S₀ 93/253.

	M.O. χλωροφύλλης 1 ¹	M.O. χλωροφύλλης 2 ²	M.O. ύψους
S ₁	37.6	35.7	24
HS	39.2	40.6	28
TC	42.1	45.8	23
B-73	41.6	48.5	20
C.V.	5.8	9.5	8.8
E.Σ.Δ. ₀₅	3.1	5.4	3
F	**	**	**

1: 1η μέτρηση χλωροφύλλης
2: 2η μέτρηση χλωροφύλλης
* : Για πιθανότητα 95%
** : Για πιθανότητα 99%

Πίνακας 23: Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S₀ 93/155.

	M.O. χλωροφύλλης 1 ¹	M.O. χλωροφύλλης 2 ²	M.O. ύψους
S ₁	35.3	38.0	23
HS	36.4	40.0	25
TC	41.1	45.8	25
B-73	41.6	48.5	20
C.V.	5.5	5.4	5.8
E.Σ.Δ. _{.05}	2.8	3.2	2
F	**	**	**

1: 1η μέτρηση χλωροφύλλης
2: 2η μέτρηση χλωροφύλλης
* : Για πιθανότητα 95%
** : Για πιθανότητα 99%

Πίνακας 24: Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S₀ 93/198.

	M.O. χλωροφύλλης 1¹	M.O. χλωροφύλλης 2²	M.O. ύψους
S₁	42.1	44.4	24
HS	42.7	43.4	27
TC	46.0	48.8	26
B-73	41.6	48.5	20
C.V.	5.7	4.4	7.5
E.Σ.Δ.₀₅	3.3	2.7	2
F	**	**	**

¹: 1η μέτρηση χλωροφύλλης

²: 2η μέτρηση χλωροφύλλης

* : Για πιθανότητα 95%

** : Για πιθανότητα 99%

• Πίνακας 25: Μέση συμπεριφορά τύπων οικογενειών κατά γενότυπο S₀ 93/153.

	M.O. χλωροφύλλης 1 ¹	M.O. χλωροφύλλης 2 ²	M.O. ύψους
S ₁	39.7	37.3	21
HS	39.5	38.5	24
TC	44.7	46.9	24
B-73	41.6	48.5	20
C.V.	5.1	6	6.8
E.Σ.Δ. _{.05}	2.8	3.5	2
F	**	**	**

1: 1η μέτρηση χλωροφύλλης
2: 2η μέτρηση χλωροφύλλης
* : Για πιθανότητα 95%
** : Για πιθανότητα 99%

